

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Biofyzikální chemie



Bc. ELIŠKA PROCHÁZKOVÁ

Antioxidační účinky analogů složek nukleových kyselin
Antioxidative effects of the analogues of nucleic acid components

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:
PharmDr. Helena Mertlíková Kaiserová PhD.

Praha, 2011

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a že řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 18. 4. 2011

Bc. Eliška Procházková

Poděkování

Na tomto místě musím poděkovat své školitelce PharmDr. Heleně Mertlíkové Kaiserové, PhD. za čas, který mi věnovala a RNDr. Ivanu Votrubovi DrSc. za to, že mi umožnil pracovat v jeho skupině.

Dále chci poděkovat Mgr. Miroslavu Hájkovi, PhD., že si vždycky našel čas a pomáhal mi řešit laboratorní úskalí, Lence Pohlové nejen jako své kolegyni, ale i kamarádce, za všestrannou podporu a velmi účinnou pomoc hlavně při práci s tkáňovými kulturami. Také bych ráda poděkovala Ing. Janě Günterové, Ing. Evě Tloušťové a Karolíně Müllerové za výraznou pomoc po stránce metodické a technické a všem z oddělení Biochemická farmakologie antimetabolitů z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za vytvoření velmi podnětného prostředí na pracovišti.

Také bych chtěla moc poděkovat Prof. RNDr. Antonínu Holému DrSc. dr.h.c.mult., nejen za jeho celoživotní vědeckou činnost a nekonečnou pracovitost, ale i za důvěru a šanci, kterou mi už v mých sedmnácti letech dal. A je mi ctí, že jsem mohla začínat u takové kapacity a navíc se zabývat testováním některých jeho látek.

Za měření a pomoc při interpretaci MS spekter děkuji Mgr. Josefu Cvačkovi, PhD.

Za motivaci a nové nápady chci poděkovat Ing. Petru Jansovi a RNDr. Martinu Dračínskému, PhD., který mi pomáhal také při měření a interpretaci NMR spekter.

Ráda bych poděkovala celé skupině NMR spektroskopie z ÚOCHB za podporu a trpělivost zejména v průběhu dokončování a sepisování této práce.

Velký dík patří mé rodině, přátelům a lidem pro mě osobně moc důležitým, které však na tomto místě nebudu jmenovitě vypisovat, protože by to zabralo mnoho stran.

V neposlední řadě chci poděkovat RNDr. Michalu Šalovi, PhD. za důvěru, neuvěřitelnou trpělivost a oporu, kterou mi byl za každých okolností.

Abstrakt

Reaktivní formy kyslíku (ROS) se v určité míře přirozeně vyskytují v organismu a mají zde např. signalizační a antimikrobiální funkce. Vznikne-li nerovnováha mezi tvorbou a zánikem ROS, hovoříme o oxidačním stresu. Ten je převážně chápán jako nepříznivý stav způsobující oxidační poškození biomolekul (lipidy, proteiny, nukleové kyseliny). Oxidační stres provází řadu tzv. civilizačních chorob a může být navozen také v důsledku farmakoterapie (nežádoucí účinky některých léčiv). Možnosti ovlivnění oxidačního stresu pomocí antioxidantů jsou stále předmětem intenzivního výzkumu.

Analogy složek nukleových kyselin představují strukturně bohatou skupinu látek s významným farmakologickým potenciálem. Zatímco jejich protivirové či cytostatické účinky jsou popsány velmi detailně, informace o jejich potenciálně antioxidačních vlastnostech se v literatuře objevují pouze sporadicky. Předmětem této práce bylo zkoumání antioxidační aktivity ve skupině 126 analogů nukleotidů, nukleosidů a nukleobází s cílem popsat strukturní motivy, které jsou za ni zodpovědné. Bylo použito několika metodických přístupů: 1) stanovení schopnosti látek zhaset ABTS radikál *in vitro* (metoda TEAC), 2) vliv látek na proces lipidové peroxidace a 3) schopnost látek ovlivňovat hladinu ROS na buněčné úrovni pomocí fluorescenční sondy CM-H₂DCF-DA.

Překvapivě nebyly nalezeny žádné látky, které by vykazovaly antioxidační aktivitu ve všech použitých testech zároveň. To je zřejmě dáno rozdílnými principy, na kterých jsou jednotlivé metody založeny. V TEAC byly nejvíce aktivní látky obsahující ve své molekule –SH nebo =S skupiny, a to pravděpodobně díky jejich snadné oxidovatelnosti na sulfinové a sulfonové kyseliny. Na proces lipidové peroxidace měly největší vliv 2,4-disubstituované 5,6-diaminopyrimidiny a u těchto derivátů byl navržen mechanismus jejich antioxidačního účinku. Byla sledována také jejich stabilita v DMSO spektrofotometricky a pomocí NMR spektroskopie. V případě buněčného modelu nebylo možné jednoznačně určit strukturní motiv zodpovědný za antioxidační vlastnosti účinných látek a sice z důvodu komplexního charakteru biologického systému, kde se mohou více uplatňovat fyzikálně-chemické vlastnosti látek nezávislé na antioxidačních účincích (např. prostupnost přes membrány).

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) naturally occur in the organisms where they play e.g. signaling and antimicrobial roles. The imbalance between ROS production and removal results in the oxidative stress. This condition is largely considered as unfavourable leading to the oxidative damage of the biomolecules (lipids, proteins, nucleic acids). The oxidative stress accompanies a number of civilization diseases and may also arise as a consequence of pharmacotherapy (side effects of some drugs). Modulation of the oxidative stress with the use of antioxidants remains a subject of intense research.

The analogs of nucleic acid components represent a structurally diverse class of compounds with important pharmacological potential. While their antiviral and cytostatic activities have been described in detail, information on their potential antioxidant activity is missing. The aim of this study was to identify the antioxidant activity in a series of 126 analogs of nucleotides, nucleosides and nucleobases and to describe structural motives responsible for this activity. Several methodological approaches have been used to reach the goal: 1) determination of the ability of the compounds to scavenge ABTS radical *in vitro* (TEAC), 2) the influence of the compounds on lipid peroxidation and 3) their ability to influence the intracellular level of ROS using the fluorescent probe CM-H₂DCF-DA.

Surprisingly, no compound was found to act as the antioxidant in all three assays at once. This is likely due to the different principles on which the methods are based. In the TEAC assay, the activity was predominantly found for the compounds containing –SH or =S groups in their molecules, which can be attributed to their easy oxidation to sulfinic and sulfonic acids. On the other hand, lipid peroxidation was most efficiently inhibited by 2,4-disubstituted 5,6-diaminopyrimidines. The mechanism of their antioxidant activity has been proposed. Stability of these compounds in DMSO was also investigated by spectrophotometry and NMR spectroscopy. In the cell-based assay, it was difficult to determine a structural motif responsible for the antioxidant activity of the compounds. This is due to the complex character of the biological system where physico-chemical properties of the compounds that are independent of their antioxidant activity (e.g. membrane permeability), are more likely to affecting the final outcome.

Seznam zkratek

AAPH	2,2'-azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) amonný
AcOH	octová kyselina
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BCA	2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-methylfenol
BSA	bovinní sérový albumin
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-fosfát
CM-H ₂ DCF-DA	5,6-dichlormethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetát
DBP	2,6-di- <i>tert</i> -butylpyridin
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrrolin-1-oxid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikál
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
ESI-HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením s ionizací elektronsprejem
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektronsprejem
FAD	flavinadenindinukleotid
FBS	fetální bovinní sérum
FRAP	ferric reducing antioxidant potential
GTP	guanosin-5'-trifosfát
HBV	virus hepatitidy B
Hep G2	buňky lidského hepatocelulárního karcinomu
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-FLD	HPLC s fluorescenčním detektorem
HPMPC	<i>N</i> ^l -(3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl)cytosin

IC ₅₀	koncentrace, při které je určitý proces inhibován z 50%
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MDA	malondialdehyd
MDA-DNA	komplex malondialdehydu s deoxyribonukleovou kyselinou
MDA-TBA	komplex malondialdehydu s kyselinou thiobarbiturovou
MEM- α Eagle	minimum essential medium Eagle
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NK	nukleové kyseliny
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrolidinon
NMR	nukleární magnetická rezonance
ORAC	oxygen radical antioxidant capacity
PBS	fyzilogický roztok pufrovaný fosfátem
PMEA	(<i>N</i> ⁹ -fosfonomethoxyeth-2-yl)adenin
PMMA	<i>R</i> -(<i>N</i> ⁹ -fosfonomethoxyprop-2-yl)adenin
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
TBA	thiobarbiturová kyselina
TCA	trichloroctová kyselina
TE	ekvivalenty troloxu
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TFA	trifluoroctová kyselina
UV	ultrafialové záření
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium-5-karboxanilid, vnitřní sůl

Obsah

1	ÚVOD.....	- 1 -
2	TEORETICKÝ ÚVOD.....	- 2 -
2.1	NUKLEOTIDY A JEJICH DERIVÁTY – VÝZNAM, STRUKTURA A VÝSKYT	- 2 -
2.2	SYNTECKÉ ANALOGY SLOŽEK NUKLEOVÝCH KYSELIN	- 4 -
2.3	ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI ANALOGŮ SLOŽEK NK.....	- 7 -
2.4	KYSLÍK A JEHO RADIKÁLOVÉ A NERADIKÁLOVÉ FORMY.....	- 7 -
2.5	DETEKCE ROS	- 10 -
2.6	BIOCHEMICKÝ A BIOMEDICÍNSKÝ VÝZNAM ROS.....	- 11 -
2.7	OXIDAČNÍ STRES V PATOGENEZI.....	- 14 -
2.7.1	<i>Kardiovaskulární choroby</i>	- 14 -
2.7.2	<i>Nádorová onemocnění</i>	- 15 -
2.7.3	<i>Neurodegenerativní choroby</i>	- 16 -
2.8	ANTIOXIDANTY A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA ORGANISMU	- 17 -
2.9	METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY LÁTEK.....	- 21 -
3	CÍLE PRÁCE	- 24 -
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 25 -
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE.....	- 25 -
4.1.1	<i>Chemikálie</i>	- 25 -
4.1.2	<i>Použité přístroje</i>	- 25 -
4.2	STUDOVANÉ LÁTKY.....	- 26 -
4.2.1	<i>Acyklické nukleosidfosfonáty</i>	- 26 -
4.2.2	<i>Analogy karbocyklických nukleosidů</i>	- 27 -
4.2.3	<i>Deriváty nukleobází</i>	- 27 -
4.3	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY LÁTEK (TEAC)	- 28 -
4.4	IZOLACE MIKROSOMŮ Z POTKANÍCH JATER	- 30 -
4.5	STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ	- 31 -
4.6	STANOVENÍ LIPIDOVÉ PEROXIDACE	- 32 -
4.7	IZOLACE A CHARAKTERIZACE LÁTEK 121-I A 121-II	- 33 -
4.7.1	<i>121-I</i>	- 33 -
4.7.2	<i>121-II</i>	- 34 -
4.8	KULTIVACE BUNĚČNÉ LINIE HEP G2	- 34 -
4.9	STANOVENÍ ROS NA BUNĚČNÉ ÚROVNI.....	- 35 -
4.10	TEST CYTOTOXICITY (XTT)	- 36 -

5	VÝSLEDKY A DISKUSE	- 38 -
5.1	TEAC.....	- 38 -
5.2	VLIV STUDOVANÝCH LÁTEK NA PEROXIDACI LIPIDŮ	- 40 -
5.3	STUDIUM ROZPADU DERIVÁTŮ 5,6-DIAMINOPYRIMIDINU	- 46 -
5.3.1	<i>Vliv teploty</i>	- 49 -
5.3.2	<i>Izolace produktů rozpadu</i>	- 50 -
5.3.3	<i>Kinetika rozpadu látky 121 pomocí NMR</i>	- 51 -
5.3.4	<i>Návrh reakčního mechanismu</i>	- 54 -
5.3.5	<i>Vliv prostředí na kondenzaci látky 121</i>	- 55 -
5.4	STANOVENÍ ROS NA BUNĚČNÉ ÚROVNI.....	- 60 -
5.5	POROVNÁNÍ POUŽITÝCH METOD	- 62 -
6	ZÁVĚR.....	- 64 -
7	POUŽITÁ LITERATURA	- 65 -

1 Úvod

Teorii oxidačního stresu navrhl Denham Harman r. 1954 a dal ji do souvislosti s procesem stárnutí [1]. Tato představa se ve výzkumu stárnutí úspěšně drží již přes 50 let. Oxidační stres však hraje roli i v jiných procesech, ve většině případů je popisován jako děj negativně ovlivňující činnost buněk i jejich organel. Vlivem něj dochází k poškození buněčných membrán, lipidů a mohou se objevovat i strukturní defekty proteinů a DNA. Oxidační stres je definován jako narušení rovnováhy mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a antioxidační ochranou buňky [2]. Reaktivní formy kyslíku se v buňce udržují na určité fyziologické hladině, která má signalizační a u některých typů buněk také antimikrobiální funkci [3].

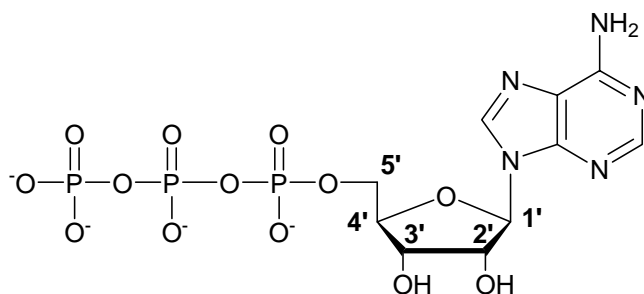
Tvorba ROS je spojena s celou řadou farmakologických procesů, jakými je mechanismus účinku léčiv, popř. jejich nežádoucí účinky. Antivirové a cytostatické účinky analogů nukleosidů a nukleotidů jsou v dnešní době prozkoumány celkem podrobně. Jejich potenciální antioxidační schopnosti však zatím nebyly detailněji popsány. Právě jejich studium je předmětem této práce.

2 Teoretický úvod

2.1 Nukleotidy a jejich deriváty – význam, struktura a výskyt

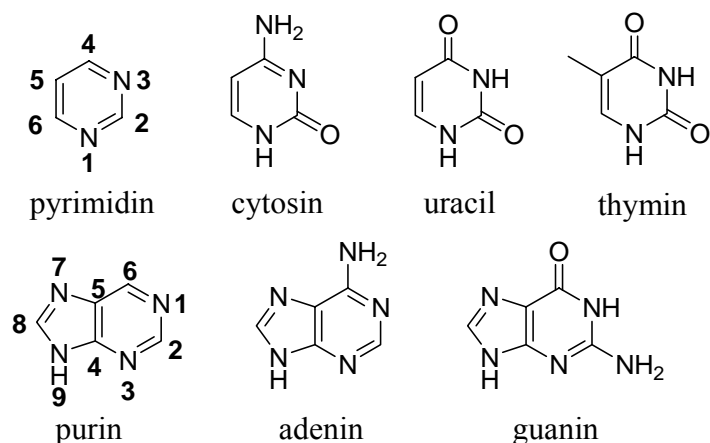
Nukleotidy jsou základními stavebními jednotkami nukleových kyselin (DNA i RNA), jejichž hlavním úkolem je uchování, přenos a zpracování genetické informace. Některé nukleotidy jsou molekuly s makroergním charakterem a mohou tedy sloužit jako aktivátory některých endergonních procesů (např. aktivace aminokyselin při proteosyntéze pomocí GTP). Dále mají důležitou úlohu v rámci některých signálních drah, např. cyklické nukleotidy, které fungují jako druzí poslové. Jsou také složkami koenzymů (FAD, NAD^+ , NADP^+ , koenzym A, S-adenosylmethionin), které jsou klíčové pro správnou funkci většiny enzymů.

Nukleotidy jsou tvořeny heterocyklickou bází, cukernou částí a fosfátovým zbytkem. Cukerná složka je k bazi vázána N-glykosidickou vazbou. Jako cukerná složka je obsažena β -D-ribose (RNA) a 2'-deoxy- β -D-ribose (DNA), která je vázána na N^1 -pyrimidin nebo N^9 -purin. Na $\text{C}5'$ cukerného zbytku je esterově vázán zbytek (1 nebo více) kyseliny fosforečné (obr. 1).



Obr. 1. Struktura adenosin-5'-trifosfátu (ATP).

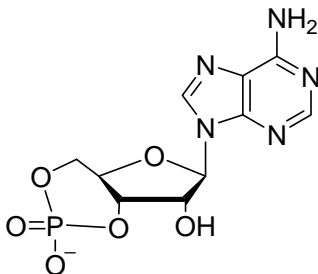
Heterocyklické baze vyskytující se v nukleových kyselinách (jinak označované jako nukleobaze) jsou odvozeny od skeletu pyrimidinu nebo purinu (obr. 2). Tyto baze mají planární prostorové uspořádání a pomocí vodíkových vazeb mohou vytvářet vzájemně komplementární dvojice. To se uplatňuje při skládání polynukleotidů do vyšších struktur společně s vodíkovými vazbami a π - π interakcemi aromatických částí (stacking).



Obr. 2. Struktura pyrimidinových a purinových bází nukleotidů.

V nukleových kyselinách se objevuje i několik kvantitativně minoritních bází. Jako příklad lze uvést 5-methylcytosin, prostřednictvím methylace cytosinu v poloze 5 je regulována genová exprese.

Nukleotidy se mohou vyskytovat také v cyklické podobě. Asi nejznámějším zástupcem je cAMP (obr. 3), které vzniká z ATP působením adenylátcyklasy a je nezbytné pro buněčnou signalizaci jako tzv. druhý posel.



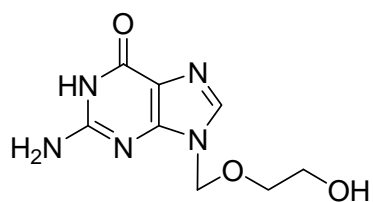
Obr. 3. Chemická struktura cAMP.

Další skupinou jsou nukleosidy. Jedná se o látky, které obsahují pouze nukleovou bází a cukernou složku. Mají od nukleotidů poněkud odlišné vlastnosti – nejsou nabitě, jsou ve vodných roztocích méně rozpustné, snáze procházejí přes buněčnou membránu. Jsou labilní v kyselých roztocích, kde se štěpí na volnou heterocyklickou bází a pentosu. Nejlabilnější jsou v tomto ohledu purinové deoxyribonukleosidy [4, 5].

2.2 Syntetické analogy složek nukleových kyselin

V chemoterapii, jejímž cílem je zastavit či zmírnit průběh onemocnění, jsou velmi často využívány analogy metabolitů – antimetabolity, což jsou syntetické deriváty přirozených metabolitů ovlivňující intracelulární metabolické dráhy. Jejich účinky jsou založeny na jejich strukturní podobnosti se substrátem enzymové reakce. Takto lze ovlivňovat metabolismus buňky nebo životní cyklus buněčných parazitů. Na tomto principu jsou založena antivirotika, cytostatika, antiprotozoální a antimikrobiální preparáty. Při návrhu nového antimetabolitu se využívají rozdíly v metabolických drahách hostitelské buňky a parazita (bakterie, virus, prvok, kvasinka) [6].

Molekulu nukleotidu (popř. nukleosidu) lze modifikovat na všech třech jejích částech, tedy na heterocyklu, cukerném zbytku i na fosfátovém konci. U pyrimidinovýchází stojí za zmínku hlavně aza a deaza modifikace cytosinového kruhu. Příkladem může být 5-azacytidin, který se používá jako cytostatikum [7] pod obchodním názvem VidazaTM. Velmi zajímavým substituovaným pyrimidinem je 5-fluorocytosin, který má antifungální účinky [8]. Purinové nukleobaze mohou navíc nabídnout záměny heteroatomů na imidazolovém kruhu, např. allopurinol (8-aza-7-deazahypoxanthin), kterým se léčí dna [9]. Neméně důležité jsou substituční analogy, jako např. deriváty 6-sulfanylpurinů využívané při léčbě nádorových onemocnění [10]. Dále je možné několika způsoby modifikovat cukernou část. Jednak lze přímo transformovat cukernou složku - cytidin fluorovaný na ribose (2',2'-difluorocytidin) používaný v klinické praxi jako protinádorové léčivo gemcitabin [11]. Další možností je zavedení heteroatomu přímo do ribosového kruhu, jako je tomu u lamivudinu (2',3'-dideoxy-3'-thiacytidin), který dnes slouží jako antivirotikum s účinkem proti HBV [12] a v menší míře proti HIV [13]. Také lze nahradit ribosový skelet metabolicky odolnějším acyklickým analogem, který je možné opět derivatizovat. Tato skupina látek je označována jako acyklické nukleosidy. Stabilizačním prvkem je pozměněný charakter vazby mezi bází a acyklickým residuem. Už se nejedná o vazbu nukleosidovou, ale chemicky stálou N-alkylovou. Asi nejznámějším zástupcem je acyklovir (9-(2'-hydroxyethoxy-methyl)guanin) účinný proti oparům [14] (obr. 4).

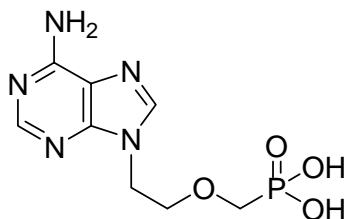


Obr. 4. Chemická struktura acykloviru.

Syntézou acyklických nukleosidů se zabývala také skupina prof. Antonína Holého z ÚOCHB AV ČR. Byly připraveny chirální acyklické deriváty. Nejjednodušší sloučenina 9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin má protivirový účinek proti RNA virům i některým DNA virům a byl schválen jako prostředek proti oparům pod obchodním názvem Duvira™ [6].

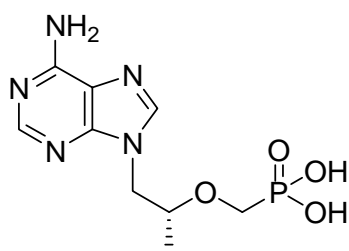
Jednou z nejzásadnějších modifikací acyklických nukleosidů je navázání fosfátu ale ne přirozeně vazbou O-P, nýbrž přes methylenový můstek O-CH₂-P. Fosfonátová funkce je vázána etherovou vazbou k hydroxylové skupině alifatického řetězce, což zajišťuje chemickou a metabolickou stabilitu. Tyto látky se souhrnně nazývají acyklické nukleosidfosfonáty a byly syntetizovány a studovány na ÚOCHB v pracovní skupině prof. Holého [15]. Výsledkem jejich dlouhodobého výzkumu jsou čtyři strukturně obdobné řady derivátů, které se od sebe liší povahou postranního alifatického řetězce. V této práci budou zmíněny jen tři typy bočních řetězců a to ty, které jsou dnes používány v klinické praxi.

První řadou z výše zmiňovaných jsou tzv. PME deriváty, které jako boční řetězec obsahují *N*-(2-(fosfonomethoxy)ethyl) skupinu, z nichž některé vykazují aktivitu i proti HIV [16]. Tuto skupinu látek reprezentuje PMEA – adefovir (obr. 5), který je aktivní proti retrovirům i DNA virům. Jeho orální profarmakum adefovir dipivoxil je od r. 2002 schváleno pro léčení chronické hepatitidy B [17] pod obchodním názvem Hepsera™.



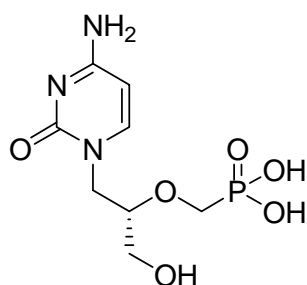
Obr. 5. Chemická struktura adefoviru.

Další skupiny látek obsahují ve svém postranním řetězci chirální atom uhlíku. Patří sem tzv. PMP deriváty, které obsahují v poloze N⁹ 2-(fosfonomethoxy)propyl [18]. Ve většině případů je biologicky aktivní jen jeden enantiomer. V PMP řadě se jedná o (*R*)-PMP. Asi nejvýznamnější z této řady je (*R*)-PMPA – tenofovir (obr. 6), který je velmi účinný proti HIV [19]. Na trhu je ve formě orálního profarmaka jako tenofovir disoproxil fumarát pod obchodním názvem Viread™. Jeho velkou výhodou je, že vůči němu vznikají rezistentní HIV mutanty jen velmi obtížně [20].



Obr. 6. Chemická struktura tenofoviru.

Třetí zmiňovanou skupinou jsou (*S*)-HPMP deriváty, což jsou látky, které ve svém bočním řetězci mají *N*-(3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl). Stejně jako u PME derivátů u nich byly prokázány antivirové vlastnosti [21]. Klinicky používaným zástupcem této skupiny je (*S*)-HPMPC – cidofovir (obr. 7), který byl r. 1996 schválen pro léčbu cytomegalovirové retinitidy pod obchodním názvem Vistide™ [22].



Obr. 7. Chemická struktura cidofoviru.

2.3 Antioxidační vlastnosti analogů složek NK

V dnešní době jsou podrobně popsány antioxidační vlastnosti mnoha strukturně odlišných látek (kap. 2.8), ale o složkách nukleových kyselin (NK) a jejich derivátech toho z hlediska antioxidačních účinků zatím mnoho nevíme. V literatuře lze nalézt informace o nových acyklických nukleosidových derivátech s antioxidačními vlastnostmi, ale z hlediska struktury už vůbec nelze hovořit o modifikovaných složkách NK. Jedná se o aldohexosované hydrazinopyrimidochinoliny, jejichž antioxidační kapacita byla stanovena několika *in vitro* metodami. V této sérii byly nalezeny látky, jejichž aktivita byla srovnatelná s askorbátem [23]. Vliv cukerné části na antioxidační aktivitu byl popsán v další práci, ve které byly testovány benzoxylované analogy nukleosidů modifikované na jejich cukerném zbytku. Několika *in vitro* metodami bylo prokázáno, že přítomnost nukleobaze je esenciální, samotná cukerná složka (různě derivovaný glukopyranosylový analog) totiž antioxidační schopnosti nevykazovala [24]. V další práci byla prozkoumána schopnost derivátů pyrolopyrimidinu chránit lipidy před peroxidací indukovanou železnatými ionty. Tento experiment byl proveden pomocí elektronové paramagnetické resonance (EPR) se spinovou pastí (kap. 2.5) [25]. Dále je možné nalézt práce, které prezentují prooxidační [26] i antioxidační [27] účinky ATP resp. ADP. V obou případech se použité koncentrace pohybují v jednotkách milimolů a antioxidační aktivita nukleotidů je úzce spojována s ovlivněním Fentonovy reakce (kap. 2.4, obr. 8). V jiné práci autoři velmi podrobně popsali inhibici Fentonovy reakce indukované měďnými ionty vlivem ATP a ADP [28]. Detailněji však toto téma řešené není.

2.4 Kyslík a jeho radikálové a neradikálové formy

Kyslík je plynný chemický prvek druhé periody a VI.A skupiny s elektronovou konfigurací $1s^2 2s^2 2p^4$. Má atomové číslo 8, relativní molekulovou hmotnost 15,999 a tři stabilní izotopy – ^{16}O (99,759%), ^{17}O (0,037%), ^{18}O (0,204%). Kromě zemské atmosféry (zhruba 21%) se vyskytuje i rozpuštěný v mořské vodě (0,212 mM) při 25 °C a v relativně malé míře (oproti vodíku) i ve vesmíru [29].

Základní forma kyslíku (molekulární) se skládá ze dvou atomů kyslíku, které mají ve své valenční vrstvě dva nepárové elektrony s paralelními spiny (tabulka I). Tato základní kyslíková forma se nazývá tripletový kyslík ($^3\text{O}_2$), je nejstabilnější a nejčastěji se vyskytující. Vyrábí se destilací zkapalněného vzduchu a uchovává se buď v kapalném stavu (bod varu kyslíku je $-182, 97\text{ }^\circ\text{C}$) ve speciálních Dewarových nádobách nebo v plynném stavu v ocelových tlakových lahvích [30].

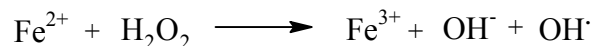
Stav, ve kterém se molekula kyslíku nachází v daleko menším zastoupení, je singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Tato forma je diamagnetická, méně stabilní a více reaktivní než tripletový kyslík. V nejvyšší energetické hladině (π^*2p) má dva elektrony s antiparalelními elektronovými spiny (tabulka I), které mohou v závislosti na vnějších podmínkách zaujímat jeden (neradikálová forma) nebo i dva (reaktivnější radikálová forma) orbitály.

Od samotné molekuly kyslíku lze odvodit ještě dvě další formy ROS-superoxidy a peroxidy. Superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$) vzniká jednoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku, čímž se do molekuly vnáší záporný náboj, a proto se jedná o anion radikál. Tato kyslíková částice je v buněčných systémech velmi reaktivní, a proto je z biochemického hlediska podrobně sledována (kap. 2.6). Další jednoelektronovou redukcí vznikne záporně nabitá částice s neradikálovým charakterem - peroxidový aniont (O_2^{2-}).

Tabulka I. Atomové orbitály kyslíku a reaktivních forem od něj odvozených, upraveno podle [31].

Energetické hladiny	Základní stav O_2		Singletový kyslík $^1\text{O}_2$		Superoxid $\text{O}_2^{\cdot-}$		Peroxid O_2^{2-}	
$\sigma 1s$	$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$	
$\sigma^* 1s$	$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$	
$\sigma 2s$	$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$	
$\sigma^* 2s$	$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$	
$\sigma 2p$	$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$	
$\pi 2p$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
$\pi^* 2p$	\uparrow	\uparrow	$\uparrow\downarrow$		$\uparrow\downarrow$	\uparrow	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
$\sigma^* 2p$								

Z peroxidu vodíku vzniká za účasti redukováných redoxně aktivních přechodných kovů jedno z nejsilnějších oxidačních činidel a sice hydroxylový radikál (OH^\bullet). Tato reakce se nazývá Fentonova (obr. 8).



Obr. 8. Chemická rovnice Fentonovy reakce.

Přestože hydroxylový radikál má velmi krátkou dobu života, pravděpodobně spouští řetězovou reakci vzniku ROS a oxidační poškození buněčných makromolekul [2].

Mezi ROS se také řadí druhý molekulární druh kyslíku ozon (O_3). Ten může vzniknout pouze tehdy, když dvouatomová molekula kyslíku disociuje na atomy. K tomuto procesu dochází nejčastěji působením ultrafialového (UV) záření. Jakmile O_2 přijme kvantum UV záření, rozštěpí se na kyslíkové atomy, které se poté velmi rychle slučují s O_2 . Vlivem rozdílné distribuce náboje je molekula ozonu na rozdíl od molekuly kyslíku polární. Za normálních podmínek je to namodralý, velmi reaktivní plyn se zápachem a se silnými oxidačními účinky. Ozon se používá také jako desinfekční přípravek [32].

Tabulka II. Přehled ROS a jejich rozdělení podle radikálového charakteru, upraveno podle [33].

Radikálové formy	Neradikálové formy
Superoxid, $\text{O}_2^{\bullet -}$	Peroxid vodíku, H_2O_2
Hydroxyl, HO^\bullet	Ozon, O_3
Hydroperoxyl, HO_2^\bullet	Singletový kyslík, $^1\text{O}_2$
Alkoxyl, RO^\bullet	
Peroxyl, ROO^\bullet	

2.5 Detekce ROS

Reaktivní formy kyslíku jsou velmi reaktivní částice, které většinou nelze detekovat přímo. Jediná přímá metoda detekce některých radikálových forem ROS je elektronová paramagnetická rezonance (EPR) [34]. Tato metoda byla využita při detekci askorbátového radikálu jako markeru oxidačního stresu [35]. Je použitelná v celé řadě uspořádání, od měření samotných radikálů v roztoku až po stanovení radikálových forem v biologických systémech, např. radikálové poškození DNA indukované systémem $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ [36]. V souvislosti s EPR se velmi často využívá tzv. spinových pastí. Zkoumaný radikál se zachytí a vytvoří stabilnější produkt, jehož EPR signál je zaznamenán. Touto metodou byly detekovány proteinové radikály, které byly takto zafixovány a následně fragmentovány působením proteas. Byl analyzován právě fragment nesoucí na sobě již zmíněnou spinovou past [37]. V další práci se autoři zabývali stanovením intracelulárního glutathionylového radikálu. V buňkách byl vyvolán oxidační stres působením H_2O_2 a glutathionylový radikál byl zachycen spinovou pastí DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrrolin-1-oxid), která je schopna vázat glutathionylový radikál. Ve výsledku byl tento adukt detekován [38].

Ve většině případů se však využívá metod nepřímých. Pro tyto účely jsou v dnešní době k dispozici hlavně fluorescenční sondy [39], které se působením ROS oxidují na fluoreskující produkt. V některých případech se naopak fluorescence sondy vlivem ROS zhasí. Některé z nich se používají pro detekci více typů reaktivních částic, jiné jsou specifické pro daný ROS (tabulka III). Nejběžnějšími nespecifickými sondami jsou deriváty fluoresceinu, které jsou schopny detekovat peroxid vodíku, peroxylový a hydroxylový radikál (např. 5,6-dichlormethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein, CM-H₂DCF-DA) [39]. V literatuře se objevuje celá řada těchto sond a stále se jejich struktura přizpůsobuje různým typům experimentů. Molekuly se chemicky modifikují tak, aby měly požadované vlastnosti (lepší transport do buňky, vyšší katabolická stabilita atd.). K dispozici jsou sondy s různými excitačními a emisními vlnovými délkami. Mohou být také cílené do určité buněčné organely např. mitochondrie (MitoSox). Lze použít i více sond najednou a pozorovat tak distribuci a migraci ROS v buňce [40].

Kromě sond fluorescenčních je možné použít pro detekci ROS také chemiluminescenční metody [41].

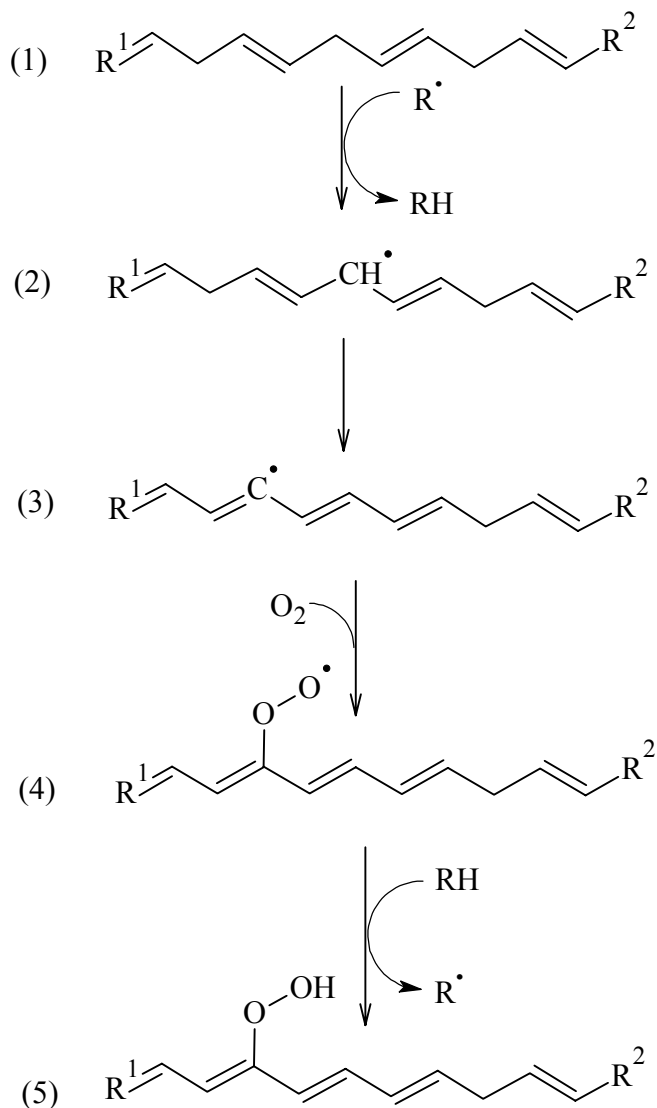
Tabulka III. Stručný přehled fluorescenčních sond specifických pro příslušné ROS.

ROS		Barviva
Superoxid	$O_2^{\bullet-}$	koelenterazin [42], hydroethidin [43-45]
Hydroxyl	HO^{\bullet}	aminofenylfluorescein, hydroxyfenylfluorescein [46]
Peroxid vodíku	H_2O_2	<i>N</i> -acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin [47]
Peroxyl	ROO^{\bullet}	difenyl-1-pyrenylfosfin [48,49]
Singletový kyslík	1O_2	<i>trans</i> -1-(2'-methoxyvinyl)pyren [50] 9,10-dimethylantracen [39]

2.6 Biochemický a biomedicínský význam ROS

Přítomnost reaktivních forem kyslíku v biologických systémech úzce souvisí s pojmem oxidační stres. Tím se rozumí nerovnováha mezi produkcí ROS a antioxidační ochranou buňky [2]. Nejvíce reaktivních částic vzniká činností respiračního řetězce v mitochondriích [51-53], dokonce lze nalézt v literatuře i cílení antioxidantů právě do těchto organel [54]. V podstatě většina membránově vázaných proteinů, které obsahují flavinové nebo chinonové koenzymy, popř. hemové enzymy a enzymy s atomem mědi v aktivním místě, produkují velké množství ROS. Dále je významná jejich produkce při transformaci xenobiotik cytochromy P450. V těchto případech se jedná primárně o superoxidový radikál. Ten se dále přeměňuje na peroxid vodíku buď samovolně nebo působením superoxiddismutasy. Vzniklý peroxid vodíku, pokud se nerozpadne samovolně, dále degraduje katalasa. Z toho vyplývá, že buňky mají jisté obranné antioxidační mechanismy. Jestliže převažuje vznik ROS, pak může docházet k peroxidaci lipidů

v membránách (obr. 9), k narušování vyšších struktur proteinů a ke strukturním změnám nukleových kyselin (DNA, RNA) vedoucím ke karcinogenezi, mutagenezi a buněčné smrti.



Obr. 9. Peroxidace nenasycených mastných kyselin, upraveno podle [55].

Lipidová peroxidace je iniciována přítomností radikálu R^\bullet , který napadá polynenasycenou mastnou kyselinu a sice na CH_2 skupině v sousedství dvojné vazby (1). Z této skupiny vytrhne vodík, čím se struktura stabilizuje, a výsledkem je radikál na nenasyceném řetězci (2). V narušeném uhlovodíkovém řetězci se elektrony přeskupí tak, aby vznikl konjugovaný dien (3), který ochotně reaguje s molekulárním kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu (4). Ten má schopnost napadat další molekuly polynenasycených mastných kyselin a přeměňovat se

na hydroperoxid (5). Velmi reaktivní hydroperoxid se rozštěpí na malondialdehyd (MDA) a dojde k rozpadu nenasyceného řetězce na dva nasycené. MDA se používá k určení stupně peroxidace a detekuje se ve formě aduktu s kyselinou thio-barbiturovou. MDA existuje ve více formách v závislosti na pH. V neutrálním nebo bazickém prostředí je ve formě enolát aniontu. V kyselém prostředí se vyskytuje jako nedisociovaný enol. Také se může tvořit intramolekulární vodíková vazba za vzniku cyklického MDA. Ve vodném prostředí podléhá aldolové kondenzaci, což má za následek vznik dimerů, trimerů i větších polymerů [56]. MDA může poškozovat proteiny, modifikovat aminokyselinová residua a tím měnit jejich biologickou funkci nebo je zcela inaktivovat. Také reaguje s DNA za vzniku MDA-DNA aduktu, modifikuje nukleobaze a má mutagenní účinky. Velmi rychle je metabolizován přes acetaldehyd až na acétát.

Reaktivní formy kyslíku mohou oxidovat i aminokyselinové zbytky proteinů a tím narušovat jejich vyšší struktury. Dokonce může dojít až k přerušení peptidového řetězce, např. při oxidaci prolinu. Kromě poškození, která vznikají působením reaktivních aldehydů vzniklých lipidovou peroxidací, mohou proteiny také agregovat. U enzymů, které obsahují atom železa ve svém kofaktoru, je také velmi pravděpodobná indukce tvorby radikálů, což má za následek pokles nebo ztrátu enzymové aktivity popř. nefunkčnost molekulárních strojů a buněčných transporterů [57]. Nezanedbatelné strukturní změny mohou způsobovat také glykace proteinů (Maillardova reakce). Jedná se o proces neenzymové kondenzace sacharidů a jejich fosfátů (popř. karbonylových skupin vzniklých oxidací aminokyselin v proteinu) s aminoskupinami proteinů za vzniku nestabilní Schiffovy báze, která podléhá dalším reakcím [58].

Nukleové kyseliny mohou být poškozeny oxidačním stresem různými způsoby. Převážně se jedná o modifikace jednotlivých nukleobází. Nejzásadnější je oxidace purinového skeletu na 8-hydroxyguanin [59], který se může po napadení hydroxylovým radikálem rozštěpit za vzniku reaktivního aldehydu. Působením hydroxylového radikálu na pyrimidinové baze vznikají adukty modifikované v polohách 5 a 6. Vedle oxidací nukleobází, které mohou zapříčinit chybné párování a následnou mutaci DNA, se objevují také jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy DNA [60]. Do určité míry je buňka schopná rozeznat poškození a využívá veškeré reparační mechanismy, popř. může aktivovat kaskádu kaspas a následně vstoupit do apoptosy.

V některých buňkách imunitního systému (leukocyty, makrofágy) dochází k produkci superoxidu záměrně. Je to součást antimikrobiálního ochranného mechanismu [61].

2.7 Oxidační stres v patogenezi

Poškození buněčných struktur působením ROS se může projevit ve formě různých onemocnění (např. kardiovaskulární choroby, nádorová onemocnění, neurodegenerativní choroby atd.).

2.7.1 Kardiovaskulární choroby

Kardiovaskulární choroby jsou jednou z hlavních příčin úmrtí na světě a jsou také často dávány do souvislosti s oxidačním stresem. Hlavním zástupcem kardiovaskulárních onemocnění je aterosklerosa. Jedná se o zánětlivé onemocnění cév způsobené ukládáním lipoproteinů do cévních stěn. Souvisí i s endotelovou dysfunkcí, narušením rovnováhy mezi vznikem a degradací trombů. Jejich nadprodukce vede k trombogenezi, čímž se zvyšuje propustnost endotelu pro lipoproteiny. Souvislost mezi vznikem aterosklerosy a oxidačním stresem spočívá v oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě (LDL partikulí). Takto modifikované LDL částice už mají pozměněné biologické vlastnosti a přispívají k vývoji nestabilního ateromového plátu [62].

S atherosklerotickým poškozením tepen je úzce spojená ischemická choroba srdeční. Částečně ucpanými cévami se k srdečnímu svalu nebo jeho části nedostává dostatečné množství okysličené krve. Ischemie se může projevit např. jako *Angina pectoris*, která způsobuje bolesti na hrudníku, a může být provázena dušností i v klidovém stavu. Jakmile je srdeční sval nedokrven delší dobu, odumírá a vnějším projevem je infarkt myokardu. Ischemické stavy v orgánech navíc navozují specifické metabolické změny, které se při obnovení prokrvení projeví zvýšenou tvorbou ROS – převážně $O_2^{\bullet -}$. Tento syndrom je označován jako ischemicko-

reperfuzní poškození a komplikuje mimo jiné i transplantace orgánů. Proto se do transportních médií často přidávají antioxidanty [63].

Také u pacientů s hypertenzí byla prokázána zvýšená produkce ROS [64].

2.7.2 Nádorová onemocnění

S nádorovými onemocněními se v dnešní době setkáváme velmi často, navíc u stále mladších pacientů. Spolu s kardiovaskulárními chorobami jsou nejčastější příčinou úmrtí. Termínem nádor se rozumí neorganizovaný shluk buněk s narušenou regulací buněčného cyklu mající tendenci rychleji proliferovat. Transformované rychle se dělící buňky epitelu mohou vytvořit karcinom. Nádory chrupavek, kostí a svalů se označují jako sarkomy. Zvláštním typem je leukémie, nádorové onemocnění krve.

Už v roce 1984 bylo prokázáno, že myši fibroblasty podléhají působením ROS maligní transformaci [65]. Reaktivní formy kyslíku mohou urychlovat proliferaci, zvyšovat aktivitu tumor supresorových genů (p53), blokovat apoptotické dráhy (inhibice kaskády kaspas) a ovlivňovat regulaci genové exprese.

U lidských i zvířecích tumorů byl prokázán zvýšený výskyt 8-hydroxy-guanosinu [66].

V další rozsáhlé studii byla popsána role oxidačního stresu v procesu karcinogeneze. Také bylo objeveno, že v buňkách tumorů je v souvislosti s oxidačním stresem snížena mezibuněčná komunikace přes buněčné spoje [67].

Cytostatika, která se používají při chemoterapii nádorových onemocnění, se dají rozdělit do několika skupin podle mechanismu účinku. Spojuje je celá řada nežádoucích účinků, mezi něž patří také zvýšená hladina ROS a s tím úzce spojená kardiotoxicita (antracykliny) a pneumotoxicita (bleomyciny). Nejenže jsou ROS produkovány při biotransformaci antracyklinů, ale navíc jsou antracykliny dobrými chelátory železa. Kardiotoxicita je navíc podpořena extrémně nízkou hladinou antioxidantních enzymů v srdci [68]. Pneumotoxicita je také úzce spojena se vznikem ROS a sledování nežádoucích účinků tohoto typu je klíčové hlavně u pacientů léčených bleomycinem. Ten se naváže na DNA, způsobí její rozštěpení a na svém druhém konci má navázané redoxně aktivní železo. Iniciátorem

patofyziologického procesu je poškození plicních kapilár a pneumocytů, z čehož se může vyvinout plicní fibrosa [69].

Polemizuje se o tom, zda by se pacientům neměly podávat antioxidanty. Tato teorie byla zatím ověřena jen na zvířecím modelu. Transgenním myším byla podávána zvýšená dávka vitamínu E a snížila se tak pravděpodobnost vzniku jaterního tumoru [70].

2.7.3 Neurodegenerativní choroby

Onemocnění z této velmi početné skupiny patří mezi zdravotně a ekonomicko-sociálně nejzávažnější. Zatím jsou neléčitelná, ale u některých můžeme zmírnit jejich průběh, popř. prodloužit délku života pacienta nebo zvýšit jeho komfort. Ve většině případů mají tyto choroby genetický základ.

Parkinsonova choroba je způsobena odumřením dopaminergních neuronů ve středním mozku, konkrétně v *Substantia nigra*. Organismus trpí nedostatkem neurotransmiteru dopaminu, což má za následek charakteristické symptomy jako je svalová rigidita (i u hladkého svalstva např. gastro-intestinálního traktu), klidový třes, potíže s mluvením. Zmíněná část středního mozku se i u zdravých jedinců vyznačuje zvýšenou přítomností ROS, která je ale kompenzována přirozenou ochranou organismu [71]. U nemocných však byla pozorována zvýšená lipidová peroxidace i oxidační poškození proteinů a DNA [72, 73]. Další aspekt, který může mít vliv na zvýšený oxidační stres pacientů, je vyšší koncentrace železa a změna jeho distribuce. V mozku zdravého jedince je nejvyšší obsah železa právě v bazálních gangliích středního mozku [74]. U nemocných byla nalezena koncentrace železa ještě vyšší a byla lokalizována v dopaminergních neuronech [75]. Vedlejším produktem metabolismu dopaminu je pigment neuromelanin, významný chelátor železa. Bylo prokázáno, že komplex neuromelaninu se železem má prooxidační i antioxidační schopnost, záleží jen na poměru obou komponent tvořících komplex, která z vlastností se projeví [76].

Další velmi často se vyskytující neurodegenerativní chorobou je Alzheimerova choroba. Ta spočívá v akumulaci patologických peptidů a proteinů, které vytvářejí amyloidní plaky. Tyto plaky poškozují neurony a buněčné spoje

mezi nimi, což může vést až k jejich odumření. Dalším velmi závažným problémem je úbytek acetylcholinu, který zajišťuje nervové vzruchy. Prvními příznaky jsou ztráta paměti, zejména té krátkodobé, problémy s vyjadřováním i plynulým mluveným projevem. V průběhu času se nemoc vyvine až v demenci a končí smrtí. Začíná pravděpodobně štěpením amyloidového prekursorového proteinu na amyloidní peptid β , který agreguje s modifikovanými biomolekulami. Aktivují se zánětlivé procesy a tvoří se neurofibrální sítě. Bylo popsáno, že amyloidní peptid β je schopný katalyzovat vznik ROS zvyšováním koncentrace H_2O_2 [77]. Ten se pak za katalýzy železem (Fentonova reakce) přeměňuje na velmi reaktivní hydroxylový radikál, který agresivně napadá biomolekuly a způsobuje rozsáhlá oxidační poškození. Dalším znakem Alzheimerovy choroby je výrazný pokles energetického metabolismu postižených neuronů. Nejenže je snížena exprese genů oxidativní fosforylace, ale také bylo prokázáno oxidační poškození transportu glukosy do buňky. Produkty lipidové peroxidace poškozují neuronální glukosové transportery. Následkem toho se rapidně sníží produkce ATP a buňka zaniká v důsledku nedostatku energie [78].

2.8 Antioxidanty a antioxidační ochrana organismu

U zdravého jedince musí panovat rovnováha mezi produkcí a detoxikací ROS, aby nedocházelo k oxidačnímu poškození buněčných kompartmentů i celých tkání. Organismus tuto rovnováhu udržuje jak enzymaticky, tak i bez účasti enzymů.

Antioxidační ochranu lze rozdělit na tři základní části. V první řadě se jedná o prevenci vzniku ROS regulací enzymů, které je produkují, popř. chelatací přechodných kovů z reaktivních stavů. Jakmile se ale ROS vytvoří, je nutné zhášení těchto částic. To probíhá buď enzymaticky nebo pomocí nízkomolekulárních látek tvořících s ROS méně toxické produkty. Dalším způsobem ochrany před trvalým poškozením vlivem oxidačního stresu jsou reparační mechanismy poškozených biomolekul.

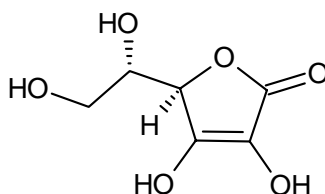
Antioxidačních enzymů je celá řada, jsou prozkoumané jejich struktury, biologické funkce, původ i další vlastnosti. Pro příklad lze uvést superoxid-dismutasu, která katalyzuje transformaci superoxidu na peroxid vodíku [79]. Ten je

následně detoxikován činností katalasy na vodu a kyslík. Nadprodukce katalasy chrání buňky před oxidačním stresem [80]. Glutathionperoxidasa zase rozkládá hydroperoxydy mastných kyselin na příslušné alkoholy a vodu. Některé produkty peroxidace lipidů jsou z těla vyloučeny ve formě konjugátů s glutathionem. Tato konjugace je zajištěna aktivitou glutathiontransferasy [81].

Kromě antioxidačních enzymů obsahují buňky i endogenní antioxidanty. Celá řada proteinů má schopnost vázat na sebe přechodné kovy a tím zamezit jejich participaci na radikálových reakcích (Fentonova reakce). Pro příklad lze uvést transferrin v plazmě, laktoferrin v leukocytech, ferritin či haptoglobin, který vychytává uvolněný toxický hemoglobin, a hemopexin, který váže volný hem. Důležitou roli hrají také proteiny s vysokým obsahem thiolových skupin, např. metalothioneiny, které prostřednictvím nich chelatují ionty přechodných kovů.

Poslední velmi významnou skupinou jsou nízkomolekulární antioxidanty. Sem patří převážně vitaminy. Některé z nich si umíme sami syntetizovat, jiné jsou pro organismus esenciální a je nutné je dodávat v potravě.

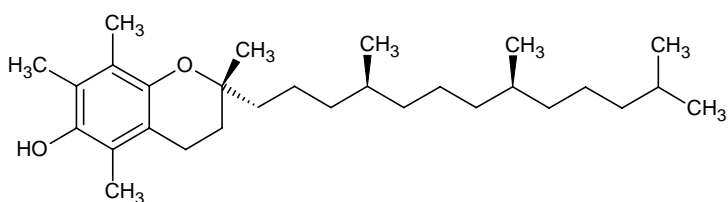
Asi nejznámějším a nejprozkoumanějším antioxidantem této skupiny je askorbát (vitamin C, obr. 10) [82]. Je to redukční činidlo, které redukuje trojmocné železo na dvojmocné a dvojmocnou měď na jednomocnou. Jeho hlavní funkcí v organismu je vstřebávání železa ze střeva do krve a regenerace uvedených přechodných kovů v aktivních centrech hydroxylas [3]. Antioxidační účinek askorbátu je popsán jako přímá redukce ROS za vzniku méně reaktivního askorbylového radikálu (semidehydroaskorbát). Ten se poté opět redukuje buď přímo dehydrogenasou za přítomnosti NADH nebo dismutuje na askorbát a dehydroaskorbát. Následuje redukce dehydroaskorbátreduktasou za účasti glutathionu zpět na askorbát [83].



Obr. 10. Struktura kyseliny L-askorbové.

Vitamin C si lidský organismus neumí biosyntetizovat, a proto je zcela odkázaný na jeho příjem z potravy. Gen pro expresi tohoto vitaminu sice máme přítomný, ale není funkční.

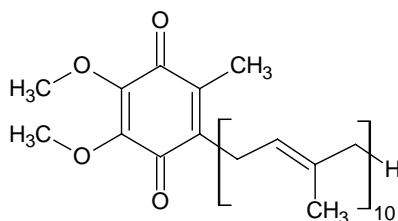
Velmi důležitým antioxidantem je α -tokoferol (biologicky neaktivnější derivát z osmi isomerů skupiny vitaminu E). Vzhledem k lipofilnímu charakteru tokoferolu (obr. 11) lze předpokládat, že jeho hlavní úlohou je ochrana buněčných membrán před lipidovou peroxidací [84].



Obr. 11. Struktura α -tokoferolu.

Protektivní schopnost tokoferolu spočívá v přeměně alkylperoxylových radikálů v procesu lipidové peroxidace na hydroperoxidy, které dále zpracovávají glutathionperoxidasy. Tokoferol se touto reakcí přeměňuje na tokoferyllový radikál, který je následně askorbátem (alespoň částečně) redukován zpět na tokoferol. Potrava je bohatá na tokoferol, a proto se s jeho deficitem setkáme jen u pacientů s poruchami střevní absorpce tuků, popř. u nezralých novorozenců.

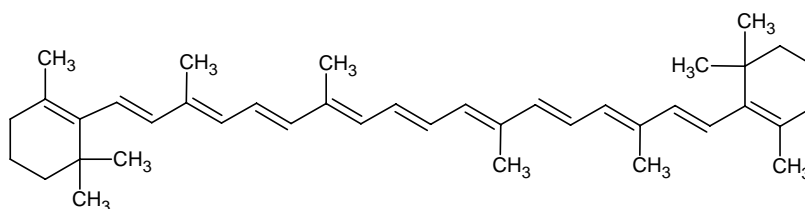
Ve spolupráci s tokoferolem chrání membrány před jejich peroxidací také koenzym Q_{10} . Chemicky se jedná o ubichinon s deseti pětiuhlíkovými isoprenovými jednotkami (obr. 12).



Obr. 12. Struktura koenzymu Q_{10} .

Tento koenzym je popsán jako přenašeč elektronů v respiračním řetězci na vnitřní membráně mitochondrií. Možná inhibuje oxidaci LDL částic a má protektivní účinek v procesu atherogeneze [85].

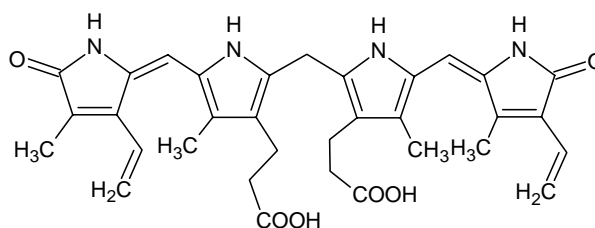
Další skupinou látek isoprenového charakteru jsou karotenoidy. Nejhojněji se vyskytujícím karotenoidem je β -karoten (obr. 13). Některé karoteny jsou prekurzory pro biosyntézu vitaminů A. Např. vitamin A₁ (retinol) je následně oxidován na retinal, který je nezbytný pro správnou činnost sítnice [86]. Také z něj vzniká kyselina retinová, která se poté účastní regulace genové exprese a diferenciaci buněk.



Obr. 13. Struktura β -karotenu.

Antioxidační úloha β -karotenu v organismu je asi nejzásadnější v kůži, kde zháší singletový kyslík vzniklý působením UV záření. Dále se uplatňuje ve zhášení alkylperoxylových radikálů pravděpodobně v kooperaci s tokoferolem.

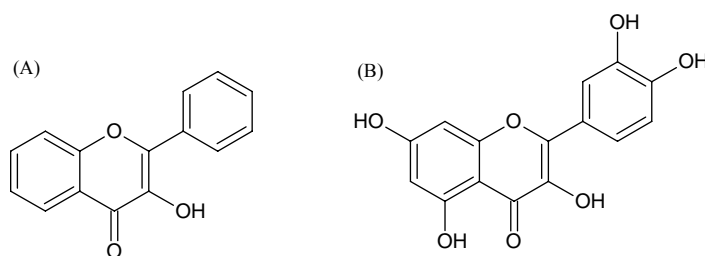
Za zmínku stojí také degradační metabolit hemu bilirubin. Jedná se o lineární tetrapyrol (obr. 14), který má kromě metabolického významu také antioxidační účinky, a to zejména v procesu peroxidace lipidů. Regeneruje totiž tokoferolový radikál. Navíc je díky své konjugaci s albuminem schopný převést radikálovou reakci do vodného prostředí [87]. Bylo také prokázáno, že zháší singletový kyslík [88].



Obr. 14. Struktura bilirubinu.

K nejdůležitějším nízkomolekulárním antioxidantům patří i početná skupina flavonoidů. Jedná se o sekundární rostlinné metabolity, které mají ve své struktuře dva benzenové kruhy spojené kyslíkatým heterocyklem (obr. 15). Mají ideální předpoklady pro antioxidační vlastnosti - jsou totiž schopné jedoelektronových

transportů. Jejich antioxidační schopnosti závisí na počtu a poloze hydroxylových substituentů na jednotlivých cyklech.



Obr. 15. Obecný vzorec flavonoidu (A) a vzorec quercetinu (B).

Nejenže flavonoidy zamezují lipidové peroxidaci, ale působí také protizánětlivě, antimikrobiálně a zabraňují karcinogenezi. Zasahují také do buněčné signalizace [89]. Navíc mají schopnost chelatovat železo, což může snižovat oxidační stres ve tkáních [90]. Pro konkrétní příklad lze uvést quercetin (obr. 15), od kterého je odvozena celá řada jiných flavonoidů, např. citrusových flavonoidů (rutin, hesperidin aj.).

2.9 Metody stanovení antioxidační aktivity látek

V současnosti je vyvinuta celá řada metod, kterými je možné sledovat antioxidační aktivitu látek na různých úrovních. Pomocí přímých metod lze zjistit zhášecí vlastnosti samotných látek, zatímco metody nepřímé slouží ke stanovení schopnosti látek snižovat oxidační poškození biologického materiálu (lipidy, proteiny i nukleové kyseliny).

V první řadě lze prostudovat zhášecí schopnost látek v přítomnosti vyvinutého radikálu bez účasti biologického materiálu *in vitro*, k tomuto zjištění se velmi často používá metoda TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) [91] a její modifikace [92]. Jejím principem je vyvinutí barevného ABTS (2,2'-azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid) radikálu a spektrofotometrické měření jeho přímého zhášení vlivem studovaných látek. Na stejném principu je založena také DPPH metoda, v průběhu které je zhášen radikál DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) [93]. Pro určení přímé antioxidační aktivity se také často

využívá metody ORAC (oxygen radical antioxidant capacity) [94]. Tímto způsobem se zjišťuje schopnost látek eliminovat kyslíkové radikály. Jako marker se v tomto případě používá β -fykoerytrin a měří se pokles fluorescence následkem zborcení vyšší struktury tohoto proteinu vygenerovaným oxidačním stresem. Vzhledem k omezením (např. fotolabilita) se ale v dnešní době tento protein nahrazuje deriváty fluoresceinu [95]. ORAC je oproti TEAC trochu složitější, ale při stanovení se využívá biologicky relevantní peroxylový radikál, který je generován vlivem AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid). Nevýhodou této metody je však vysoká citlivost na pH. Podrobnější porovnání obou metod je popsáno v literatuře [96].

Ke stanovení antioxidační schopnosti lze využít redoxních vlastností látek a jejich reaktivity. Nejběžnější metodou tohoto typu je FRAP (ferric reducing antioxidant potential) a je založena na redukci železitého komplexu (Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) vlivem antioxidačně aktivní látky za vzniku barevného železnatého komplexu (Fe^{2+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin), jehož absorbance je měřena [97]. Tato metoda má však celou řadu nevýhod. Kromě měření při nefyziologicky nízkých hodnotách pH je také nemožné zachytit aktivitu pomalu reagujících antioxidantů (např. polyfenoly) [98]. Výsledkem je stanovení schopnosti látek redukovat železité ionty, což nemusí zcela korelovat s jejich celkovou antioxidační aktivitou [99].

Stanovení redoxních vlastností látek je možné sledovat také elektrochemicky. K tomuto účelu se využívá cyklická voltametrie. Touto metodou lze zaznamenat schopnost látek odevzdávat jednotlivé elektrony. Redukční chování látek se vyhodnocuje z anodického oxidačního píku a jeho anodického proudu. Data získaná z cyklických voltamogramů většinou korelují s výsledky získanými jinými metodami stanovení antioxidační aktivity [100]. V souvislosti s posuzováním antioxidační aktivity látek je možné se setkat s elektronovou paramagnetickou rezonancí (EPR) (kap. 2.5). Tato spektroskopická metoda slouží k detekci nepárových elektronů a lze ji tedy specificky využít k identifikaci a stanovení volných radikálů. Měření mohou probíhat v několika uspořádáních, přímo v roztoku nebo i na buněčném modelu [101]. Nevýhodou je však nákladné přístrojové vybavení.

Často využívanou metodou je sledování vlivu studovaných látek na peroxidaci lipidů. Test je založen na spektrofotometrickém stanovení jednoho

z hlavních produktů procesu lipidové peroxidace, kterým je malondialdehyd (MDA). Ten se detekuje chelatací kyselinou thiobarbiturovou (TBA) za vzniku barevného MDA-TBA aduktu [102, 103]. Látky s potenciálními antioxidačními schopnostmi by tedy měly snižovat koncentraci MDA-TBA aduktu. Jako biologický model se pro toto stanovení využívají mikrosomy z potkaních jater [104]. Nevýhodou zde může být případná interference dalších produktů v oblasti vlnové délky měření, to je však možné odstranit separací reakční směsi na HPLC s fluorescenčním detektorem (HPLC-FLD). Stejným způsobem lze stanovit i další produkty lipidové peroxidace (např. 4-hydroxynonenal).

Míra poškození proteinů se určuje převážně metodou stanovení stupně karbonylace proteinů. Aminokyselinová residua mohou být přeměňována vlivem ROS na karbonylové deriváty, jejichž koncentrace pak může fungovat jako marker proteinového poškození. Koncentrace vzniklých karbonylových skupin se po reakci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem stanovuje spektrofotometricky [105]. Tyto produkty mohou vznikat také v procesu glykace proteinů (kap. 2.6).

Vlivem oxidačního stresu se mohou oxidovat i nukleové kyseliny (kap. 2.6). Je tedy možné stanovit stupeň oxidačního poškození DNA prostřednictvím stanovení koncentrace oxidovaných nukleobází. Většinou se stanovuje množství 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu v DNA řetězci pomocí 3D-HPLC s elektrochemickou detekcí [106].

3 Cíle práce

1. Zavedení metodik pro detekci ROS, stanovení antioxidační kapacity látek a markerů oxidačního stresu:
 - TEAC
 - Lipidová peroxidace
 - Intracelulární tvorba ROS
2. Stanovení antioxidačních vlastností 126 analogů složek nukleových kyselin výše uvedenými metodami a jejich vzájemné porovnání.
3. Studium rozpadu derivátů 2,4-disubstituovaných 5,6-diaminopyrimidinů a návrh mechanismu jejich antioxidačního účinku v procesu peroxidace lipidů.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Sigma Aldrich: trolox, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) amonný (ABTS), $K_2S_2O_8$, dimethylsulfoxid (DMSO), 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylfenol (BHT), thiobarbiturová kyselina (TBA), trisma base, L-askorbová kyselina, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 4% vodný roztok $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2,2'-bichinolin-4,4'-dikarboxylová kyselina (BCA), quercetin a 2,2'-azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid (AAPH), médium Minimum essential Eagle, fyziologický roztok pufrovaný fosfátem (PBS), antibiotika (výsledná koncentrace 100 jednotek penicillinu + 0,1 mg streptomycinu/ml), pyridin, 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin (DMAP), 2,6-di-*tert*-butylpyridin (DBP), triethylamin

Serva: fosfátové soli pro přípravu pufrů a trichloroctová kyselina (TCA)

Penta: HCl, *n*-butanol, amoniak, octová kyselina (AcOH) a peroxid vodíku

Invitrogen: fluorescenční sonda pro detekci ROS na buněčné úrovni 5,6-dichlor-methyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetát (CM-H₂DCF-DA), 0,25% trypsin + 0,01% EDTA

PAA: fetální bovinní sérum (FBS)

Roche: XTT kit

TPP: plastikové kultivační lahvičky (75 cm²), 96-jamkové destičky, sterilní pipety

Merck: deuterovaný DMSO

4.1.2 Použité přístroje

pH metr PHM 240 (Radiometer analytical)

Analytické váhy (BEL engineering)

Spektrofotometr DU-800 (Beckman Coulter)

Spektrofluorimetr TECAN M-1000 (TECAN)

HPLC aparatura Aliance HT a fluorescenční detektor (Waters)

HPLC kolona Nova-Pack C18 (3,9x150 mm) (Waters)

Centrifuga Avanti J-25I (Beckman Coulter)

Ultracentrifuga Optima LE-80K (Beckman Coulter)

NMR spektrometr 500 (Bruker)

Hmotnostní spektrometr LCQ Fleet (Thermo Fisher Scientific)

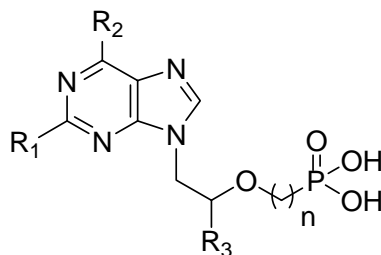
Hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)

4.2 Studované látky

V této práci bylo studováno celkem 126 sloučenin. Tuto velkou a nesourodou skupinu látek je možné rozdělit podle strukturních motivů do několika podskupin.

4.2.1 Acyklické nukleosidfosfonáty

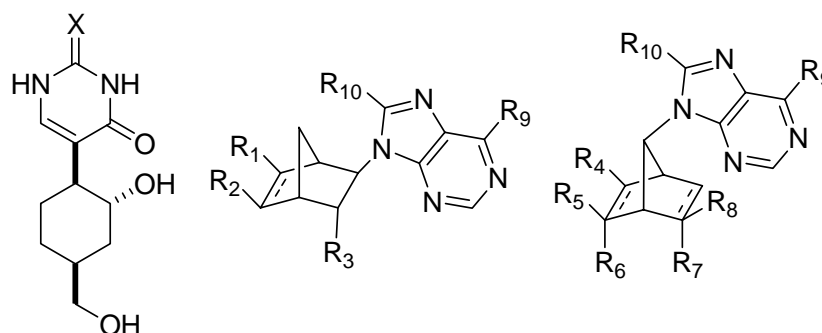
Acyklické nukleosidfosfonáty byly připraveny na našem ústavu pracovní skupinou prof. Holého (kap. 2.2). Některé z nich jsou již klinicky používané (např. adefovir, tenofovir, cidofovir), další jsou ještě neprozkoumané a některé jsem syntetizovala pod vedením prof. Holého v rámci své bakalářské práce [107]. Tyto látky lze označit společným obecným vzorcem (obr. 16). V jejich molekule může být obsažena i pyrimidinová base (cytosin, thymin) místo purinové uvedené na obrázku níže.



Obr. 16. Obecný chemický vzorec testovaných acyklických nukleosidfosfonátů: R₁ - H, OH, NH₂; R₂ - H, OH, NH₂, NH-alkyl, Cl, SH, S-alkyl; R₃ - H, CH₃, CH₂OH; n=1,2.

4.2.2 Analogy karbocyklických nukleosidů

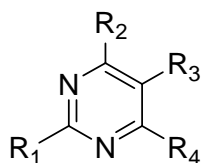
Analogy karbocyklických nukleosidů (obr. 17) lze odvodit od přírodních nukleosidů nahrazením hemiacetalového atomu kyslíku na ribosovém cyklu methylenovou skupinou $-\text{CH}_2-$ [108-110]. Takto modifikované látky vynikají metabolickou a chemickou stabilitou vazby mezi heterocyklickou bází a uhlíkovým skeletem a zároveň se tyto látky díky své zvýšené lipofilitě snadněji transportují přes buněčnou membránu. Hemiacetalový kyslík může být rovněž nahrazen ethylenovou $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ skupinou (cyklohexanové nukleosidy) a jinými dalšími skupinami [111]. Významnou podskupinu těchto látek tvoří karbocyklické konformačně uzamčené nukleosidy, které nesou jako pseudocukernou část norbornanový (bicyklo[2,2,1]heptan) nebo norbornenový (bicyklo[2,2,1]-hepten) skelet. Tyto deriváty syntetizoval RNDr. Michal Šála, PhD. a byly připraveny jako potenciální antivirotika [112, 113]. U některých z nich se tyto účinky opravdu prokázaly [114].



Obr. 17. Obecný chemický vzorec analogů karbocyklických nukleosidů: X = O, S, NH; R₁ = H, OH, oxo, gem-F,F; R₂ = H, OH; R₃ = H, CH₂OH; R₄ = H, OH; R₅ = H, CH₂OH; R₆ = H, CH₂OH; R₇ = H, CH₂OH; R₈ = H, CH₂OH; R₉ = Cl, OH, SH, SCH₃, SO₂CH₃, COOMe; R₁₀ = H, Br, OH.

4.2.3 Deriváty nukleobází

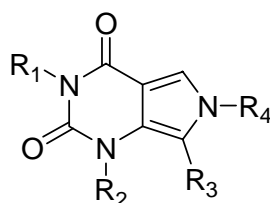
K dispozici byly deriváty jak purinových tak pyrimidinových skeletů. Struktura testovaných analogů pyrimidinových bází je znázorněna na obr. 18. Pro studii je připravili Ing. Petr Jansa a Lucie Čechová dle literatury [115-117].



Obr. 18. Deriváty pyrimidinových heterocyklů: R_1 – OH, NH_2 , NH -alkyl, N -dialkyl, NH -CHO, Cl, R_2 – OH, OCH_3 , Cl, NH_2 , NH -alkyl, N -dialkyl, R_3 – H, alkyl, aryl, CH_2OH , NH_2 , R_4 – OH, OCH_3 , CH_3 , Cl, NH_2 , NH -alkyl, N -dialkyl, $CHBr_2$.

Některé deriváty 5,6-diaminopyrimidinu (117: R_1 , R_2 – OH, R_3 , R_4 – NH_2 ; 123: R_1 , R_2 – OH, R_3 – NH_2 , R_4 – H; 124: R_1 – SH, R_2 – OH, R_3 , R_4 – NH_2 ; 125: R_1 – H, R_2 , R_4 – Cl, R_3 – NH_2 ; 126: R_1 – H, R_2 – OH, R_3 , R_4 – NH_2) byly pořízeny od firmy Sigma Aldrich.

Druhým typem testovaných analogů nukleobází jsou modifikované purinové heterocykly. Jsou nejen různě substituované v polohách 2, 6, 8 a 9 na purinovém skeletu, ale mají také různě modifikované heteroatomy přímo na imidazolovém kruhu. Tyto látky byly připraveny jako strukturní analogy allopurinolu, tedy potenciální inhibitory xanthinoxidasy a léčiva závažného onemocnění dna. Tyto látky byly syntetizovány kolegou Davidem Mařákem [118, 119].

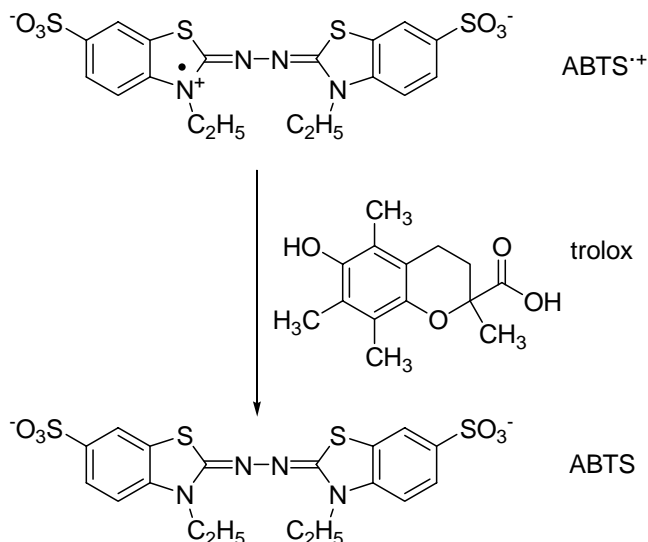


Obr. 19. Obecný strukturní vzorec modifikovaných purinových derivátů; R_1 – H, CH_2OH , CH_3 , aryl, R_2 – H, CH_2OH , CH_3 , $(CH_2)_8-PO_3Na_2$, R_3 – H, SO_2Ar , $COOH$, $COOC_2H_5$, R_4 – H, CH_3 , PME-diisopropylester.

4.3 Stanovení antioxidační kapacity látek (TEAC)

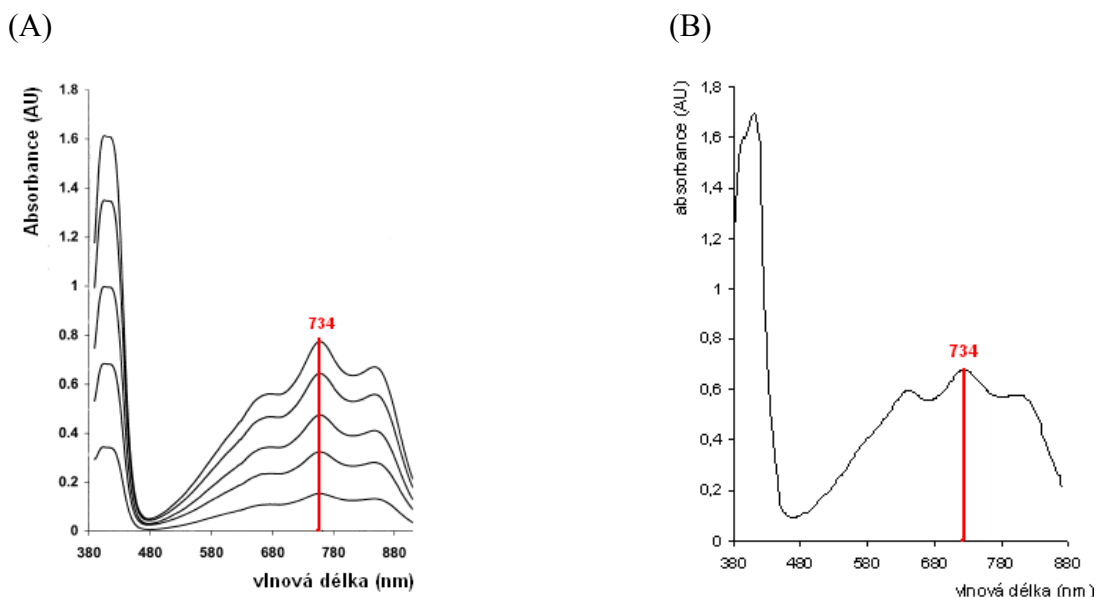
Metoda slouží k určení antioxidační kapacity látek ve srovnání s roztoky standardu. Jako standard se v této metodě používá trolox, ve vodě rozpustný strukturní analog vitamínu E (kap. 2.8). V reakční směsi dojde k vyvinutí zelenomodrého $ABTS^{+}$ kation radikálu, který absorbuje záření při vlnové

délce 734 nm. Spektrofotometricky se měří schopnost látek zhášet tento radikál (obr. 20) – roztok se odbarvuje. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí kalibračního grafu (kap. 5.1, obr. 26).



Obr. 20. Připravený kation radikál $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se po reakci s antioxidantem (v tomto případě znázorněný trolox jako standard) redukuje na bezbarvý produkt, upraveno podle [120].

Kation radikál ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) byl vyvinut oxidací persulfátem. K 10 ml 7 mM roztoku ABTS ve vodě bylo přidáno 6,6 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (výsledná koncentrace 2,5 mM). Reakční směs se po promíchání nechala 16 h odstát za laboratorní teploty ve tmě. Po této době byl roztok radikálu naředěn asi 100x 10 mM fosfátovým pufrem (pH 7,3) do výsledné absorbance přibližně 0,7 [91]. Bylo změřeno absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek 380-880 nm pro ověření přítomnosti $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Toto spektrum bylo konfrontováno s literaturou, jak je uvedeno na obr. 21.



Obr. 21. Absorpční spektrum ABTS⁺. Červeně je vyznačena vlnová délka, při které byla odečítána absorbance. (A) Absorpční spektrum ABTS⁺ popsané v literatuře [91], (B) naměřené absorpční spektrum ABTS⁺.

K 1 ml naředěného roztoku ABTS⁺, který byl vytemperován na 30 °C, bylo pipetováno 10 μ l roztoku standardu troloxu resp. testované látky (výsledná koncentrace 20 μ M) a byla změřena absorbance na počátku a po přidavku vzorku v čase 60 s. Byl proveden screening všech studovaných látek. Ty z nich, které vykazovaly jistou antioxidační aktivitu (pokles hodnoty absorbance minimálně o 20%), byly dále zkoumány z hlediska kvantitativního. Byla sledována míra zhášecího účinku pomocí koncentračních křivek. Byl sestaven graf závislosti rozdílu absorbancí v čase 0 a 60 s na koncentraci. Dále byly porovnány směrnice regresních přímk antioxidačně aktivních látek se směrnici kalibrační křivky troloxu (kap. 5.1).

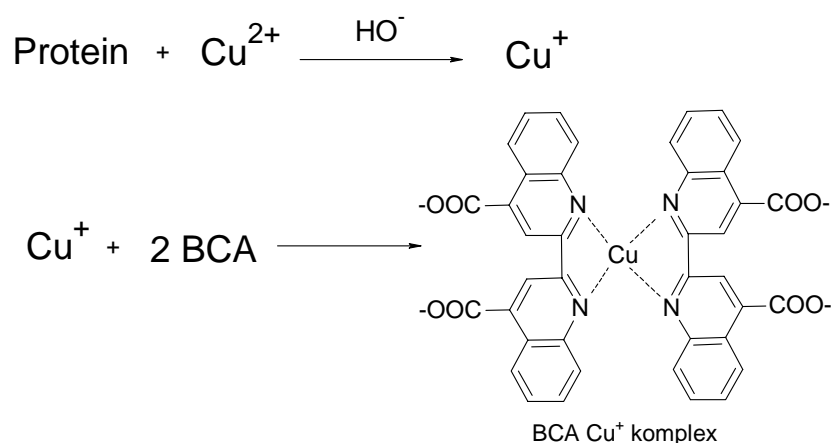
4.4 Izolace mikrosomů z potkaních jater

Mikrosomy byly izolovány z 50 g potkaních jater frakční centrifugací [121]. Játra byla nejprve nakrájena na tenké plátky, které byly poté přepasírovány přes sítko a postupně proplachovány 0,1 M fosfátovým pufrém (pH 7,4). Filtrát byl zhomogenizován v homogenizátoru dle Dounce (20xA, 20xB) a poté centrifugován 15 min při 2500 x g, 4 °C. Dále se pracovalo se supernatantem, který byl

centrifugován 60 min při 20000 x g. Peleta byla promyta malým množstvím 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,4) a supernatant byl opět centrifugován, tentokrát 100 min při 100000 x g. V peletě se nacházely mikrosomy, které byly resuspendovány, a v supernatantu byl přítomen cytosol. Množství mikrosomů bylo kvantifikováno pomocí stanovení koncentrace proteinů.

4.5 Stanovení koncentrace proteinů

Principem metody je reakce peptidové vazby v proteinech s měďnatými ionty v alkalickém prostředí. Dochází k jejich redukci na ionty měďné, které jsou následně chelatovány dvěma molekulami BCA za vzniku červeného komplexu (obr. 22), který absorbuje záření při vlnové délce 562 nm [122].

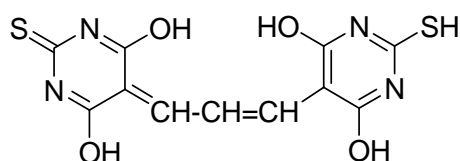


Obr. 22. Vznik barevného měďného komplexu.

Byly připraveny kalibrační roztoky ze zásobního roztoku bovinního sérového albuminu (BSA) o koncentraci 0 - 1 mg/ml. Do jamek v 96-jamkové destičce bylo pipetováno 25 μ l roztoku standardu resp. vzorku (10 x, 20 x a 50 x ředěného, vše duplikovaně) a 200 μ l činidla (BCA/ 4% CuSO₄.5H₂O 50:1). Po přidavku činidla byla destička inkubována 30 min při 37 °C. Po inkubaci byla změřena absorbance v jamkách destičky s použitím filtru 540 nm. Data byla zpracována metodou kalibrační křivky. Výsledné hodnoty z 10 x, 20 x a 50 x ředěného vzorku byly zprůměrovány.

4.6 Stanovení lipidové peroxidace

Metoda je založena na tvorbě hydroxylového radikálu OH^\bullet , který je generován systémem askorbát/ Fe^{2+} . Takto se to sice uvádí v literatuře [123], ale v reálném experimentu se tohoto procesu účastní také vzdušný kyslík. Askorbát je důležitý pro redukci rychle a ochotně vznikajících Fe^{3+} iontů zpět na Fe^{2+} , které mohou podléhat oxidaci za vzniku OH^\bullet (Fentonova reakce, obr. 8). Dochází k peroxidaci mikrosomálních lipidů (kap. 2.6). Hlavním produktem lipidové peroxidace je malondialdehyd (MDA), který následně reaguje s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Vzniká MDA-TBA adukt, jehož koncentrace je stanovena (obr. 23). Kvantitativní analýza probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm a referenční vlnové délce 600 nm nebo pomocí HPLC-FLD při excitační vlnové délce 532 nm a emisní vlnové délce 553 nm. Jako kontrola byl použit 1% DMSO ve vodě vzhledem k faktu, že studované látky byly ředěny z 10 mM roztoků v DMSO na výsledné 1% DMSO ve vzorku.



Obr. 23. MDA-TBA adukt, jehož absorbance resp. fluorescence byla měřena.

Mikrosomy byly rozmrazeny a ponechány 5 min ve vroucí vodě (deaktivace enzymů). K takto připraveným mikrosomům o výsledné koncentraci proteinů 1,5 mg/ml bylo pipetováno 50 μl Tris-HCl pufru (pH 7,5, výsledná koncentrace 100 μM), 50 μl roztoku látky (výsledná koncentrace 20 μM s obsahem 1% DMSO) a 75 μl askorbátu (výsledná koncentrace 200 μM). Reakce byla zahájena přidavkem 25 μl železnatých iontů (výsledná koncentrace 10 μM) a probíhala za přístupu vzduchu (otevřené zkumavky na třepačce) při 37 °C. Inkubační doba byla empiricky stanovena na 20 min (kap. 5.2, obr. 28). Po této době byla reakce ukončena napipetováním 150 μl reakční směsi do 1 ml ledově vychlazené determinační směsi. Vzorky byly zahřívány ve vodní lázni na 95 °C po dobu 30 min (vznik MDA-TBA aduktu). Poté byly 5 min chlazeny na ledu (ustálení barvy) a následně

centrifugovány 15 min při 1000 x g (usazení zbytků lipidů). Absorbance supernatantu byla měřena při 530 nm a referenční vlnové délce 600 nm.

Pro HPLC analýzu byly vzorky dále zpracovány. Bylo odebráno 800 µl vzorku a vytřepáno do 348 µl *n*-butanolu. Extrakční směs byla promíchána vortexem a fázové rozhraní bylo zaostřeno centrifugací. Bylo odebráno 200 µl organické fáze a na HPLC kolonu injektováno 20 µl. Pro eluci MDA-TBA aduktu byla zvolena mobilní fáze 35% methanol + 65% vody s 0,05% trifluoroctové kyseliny (TFA). Fluorescenční detektor byl nastaven na excitační vlnovou délku 532 nm a emisní vlnovou délku 553 nm.

Determinační směs: 10 ml TCA-HCl (2,2 ml 35% HCl; 197,8 ml vody; 33,6 g TCA, 41,6 mg TBA a 1 ml BHT).

4.7 Izolace a charakterizace látek 121-I a 121-II

Oba izolované produkty rozpadu látky 121 (121-I a 121-II) byly charakterizovány pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (100 000) s ionizací elektronsprejem (ESI-HRMS). Pro měření pomocí NMR spektroskopie byly vzorky rozpuštěny v deuterovaném DMSO, pro ESI-HRMS v 10% DMSO v methanolu.

4.7.1 121-I

1 g látky 121 byl rozpuštěn v 710 ml DMSO. Za stálého míchání a při laboratorní teplotě byla sledována jeho degradace na fialový produkt. Po jednom týdnu za výše uvedených podmínek byl fialový produkt 121-I vysrážen dvěma objemovými ekvivalenty vody. Výtěžek reakce byl 0,71 g (76%).

¹H NMR: 8,30, 8,60 ppm (NH₂ skupiny), 10,97 ppm (NH skupiny).

¹³C NMR: 115,84; 153,78; 156,48; 165,59 ppm.

ESI-MS: m/z: 264,1 [M+H]⁺, 286,1 [M+Na]⁺

ESI-HRMS: m/z: 264,09542 [M+H]⁺, což s největší pravděpodobností odpovídá tomuto sumárnímu složení: C₈H₁₀N₉O₂ [M+H]⁺ s chybou měření 0,83 ppm.

4.7.2 121-II

1 g látky 121 byl rozpuštěn v 710 ml DMSO. Po týdnu míchání za laboratorní teploty byl k reakční směsi přidán jeden objemový díl methanolu a směs byla refluxována po dobu 10 min. Reakce proběhla téměř kvantitativně a vyloučená žlutá sraženina 121-II byla odfiltrována.

^1H NMR: 7,40, 8,91, 9,06 ppm (NH_2 skupiny), 11,66 (NH skupiny).

Vzhledem k velmi nízké koncentraci látky ve vzorku (vlivem nízké rozpustnosti) a vzhledem k nízké citlivosti měření jader ^{13}C nebylo možné změřit u tohoto vzorku ^{13}C NMR.

ESI-MS: m/z : 246,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 268,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

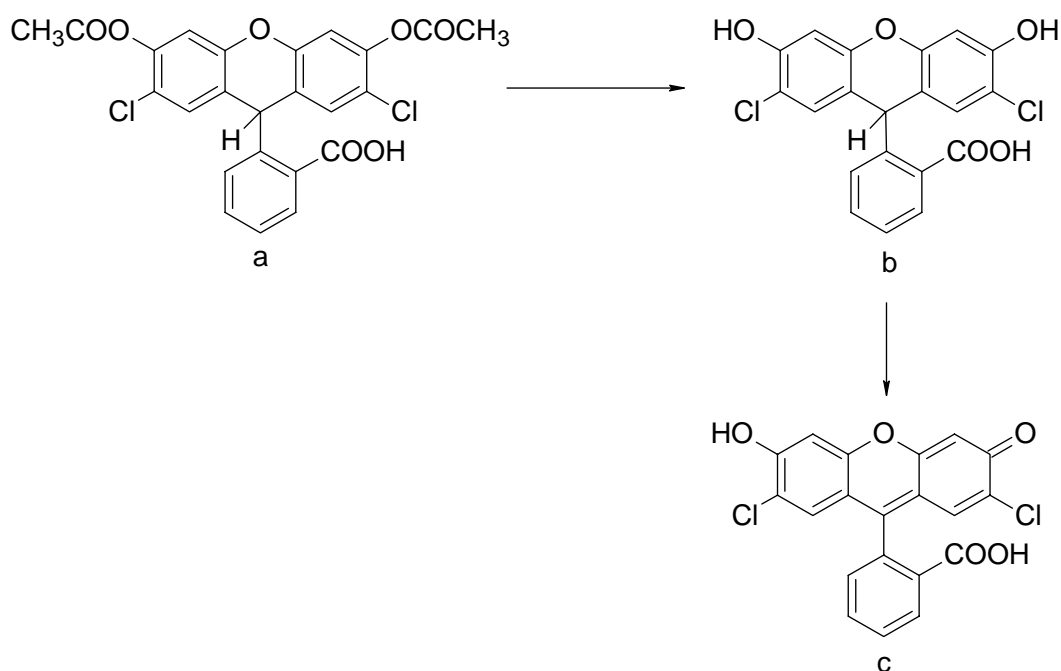
ESI-HRMS: m/z : 246,08482 $[\text{M}+\text{H}]^+$, což s největší pravděpodobností odpovídá tomuto sumárnímu složení: $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_9\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ s chybou měření 0,78 ppm.

4.8 Kultivace buněčné linie Hep G2

Jako buněčný experimentální model byla zvolena linie lidských jaterních nádorových buněk Hep G2 (Hep G2 buňky dodala firma ATCC, kat. č. HB-8065). Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C a atmosféře 5% CO_2 v plastických kultivačních lahvičkách (75 cm^2). Buňky rostly v médiu MEM- α Eagle doplněném o 10% FBS, 2 mM glutamin a směs antibiotik (100 jednotek streptomycinu + 0,1 mg penicilinu/ml). Pasážování probíhalo dvakrát týdně a protože buněčné linie rostly přisedle na dně kultivační lahvičky, bylo nutné docílit jejich uvolnění z povrchu pomocí trypsinu. Médium bylo odsáto a buňky opláchnuty 2 ml PBS. Byl přidán 1 ml 0,25% trypsinu s 0,01% EDTA a po inkubaci (2 min, 37 °C, 5% CO_2) bylo k buňkám přidáno kultivační medium. Po důkladném resuspendování byly buňky rozděleny do kultivačních lahviček v pasážovacím poměru 1:1 – 1:3.

4.9 Stanovení ROS na buněčné úrovni

Produkce ROS v buňkách byla sledována pomocí fluorescenční sondy (CM-H₂DCF-DA), která je transportována přes membránu ve formě diacetátu. Působením buněčných esteras se acetátové skupiny odštěpí a vzniklý produkt je oxidován přítomnými ROS na fluoreskující produkt (obr. 24). Oxidovaná forma je excitována zářením o vlnové délce 485 nm a poskytuje fluorescenční signál při emisní vlnové délce 535 nm. Byl sledován vliv testovaných látek na přirozenou hladinu ROS v buňce a také byla pozorována jejich schopnost snižovat indukovanou, nefyziologickou úroveň ROS. Jako generátory oxidačního stresu v buňkách byly použity H₂O₂, který je schopný vyvolat v buňce vznik OH[•], a AAPH, který způsobuje vznik alkylradikálů. Jako pozitivní kontrola antioxidačních vlastností byl použit flavonoid quercetin (výsledná koncentrace 20 μM).



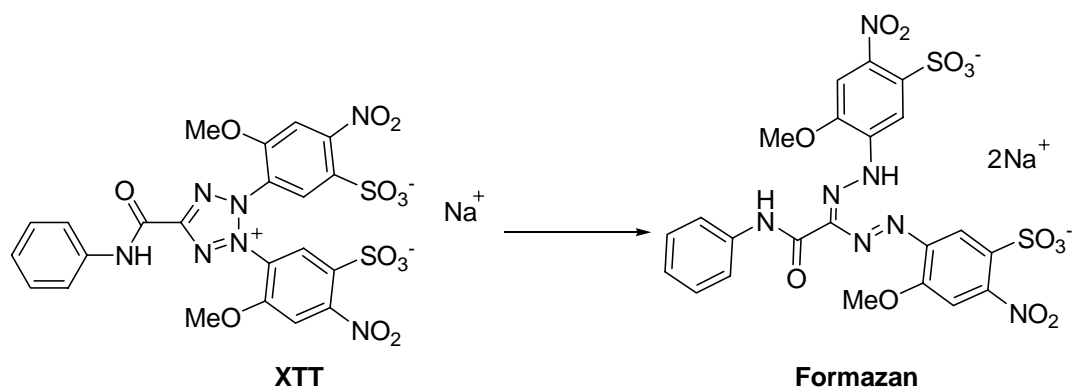
Obr. 24. Aktivace fluorescenční sondy působením ROS, upraveno podle [39]. Látka **a** je komerčně dostupná (CM-H₂DCF-DA), působením buněčných esteras vzniká látka **b**, která je vlivem ROS oxidována na produkt **c**, jehož fluorescence je měřena.

Hep G2 buňky byly vysazeny na 96-jamkovou černou destičku [124] v koncentraci 10 000 buněk/jamka. Byly ponechány přes noc v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Za 24 h bylo přidáno 10 µl testované látky (nebo 0,2 % DMSO v PBS v případě kontroly), aby výsledná koncentrace byla 20 µM. Opět se ponechaly v inkubátoru 24 h. Po odsátí media byly jamky promyty 100 µl PBS a po přidání 100 µl roztoku CM-H₂DCF-DA (1 µM) byla destička inkubována 30 min v inkubátoru. Poté byly jamky opět promyty 100 µl PBS a následně byl indukován oxidační stres pomocí 1 mM AAPH, inkubace 2 h v inkubátoru. Po této době byla naměřena intenzita fluorescence při emisní vlnové délce 535 nm (excitační vlnová délka 485 nm). Pro experimenty s využitím 1 mM H₂O₂ jako induktoru oxidačního stresu byla koncentrace sondy zvýšena na 10 µM [125, 126].

4.10 Test cytotoxicity (XTT)

Princip tohoto testu spočívá v přeměně žluté tetrazoliové soli XTT na oranžový formazan (obr. 25) mitochondriálními enzymy metabolicky aktivních (živých) buněk [127]. Měří se absorbance produktu této reakce při vlnové délce 492 nm a při referenční vlnové délce 690 nm. Hep G2 buňky byly pipetovány do průhledné 96-jamkové destičky v množství 10 000 buněk/jamka. Přes noc byly ponechány v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) a po 24 h byly k buňkám přidány testované látky (výsledná koncentrace 20 µM). Po 24 h působení látek v inkubátoru bylo do každé měřené jamky přidáno 50 µl XTT směsi A:B 50:1. Absorbance produktu byla měřena po hodinové inkubaci v inkubátoru.

XTT kit: roztok A: XTT (1 mg/ml); roztok B: *N*-methyldibenzopyrazinmethylsulfát (1,25 mM).

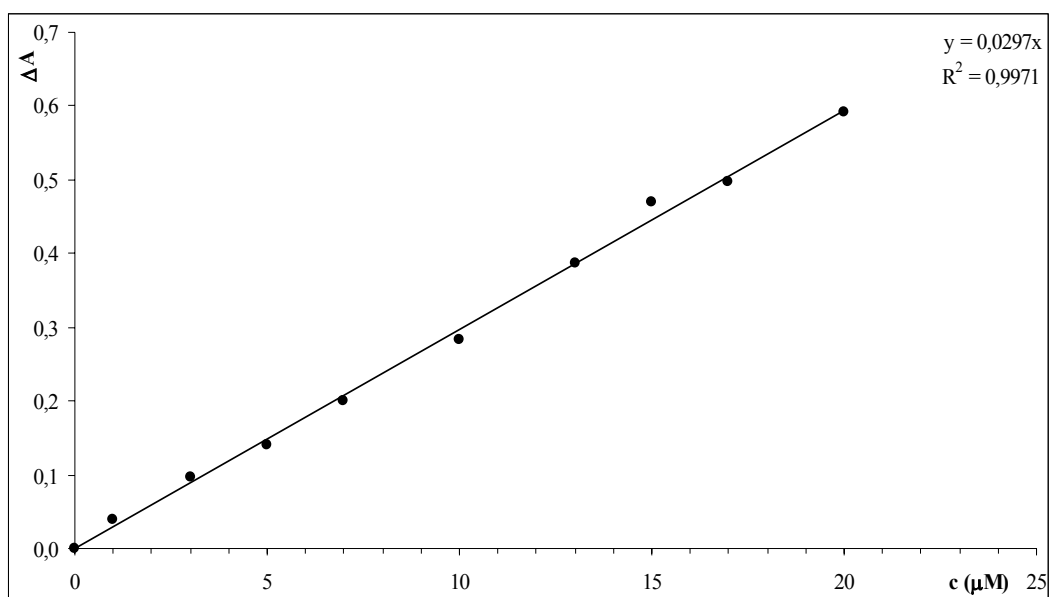


Obr. 25. XTT je přeměněno mitochondriální reduktasou na oranžově zbarvený formazan, jehož absorbance v daném vzorku je úměrná množství metabolicky aktivních buněk.

5 Výsledky a diskuse

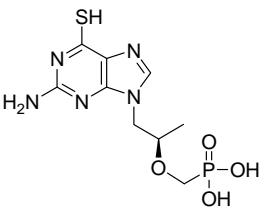
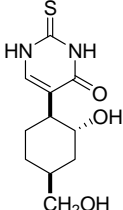
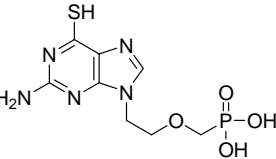
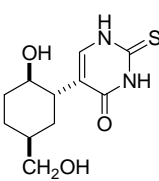
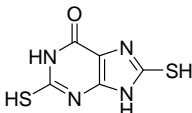
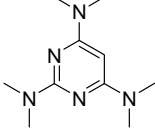
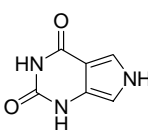
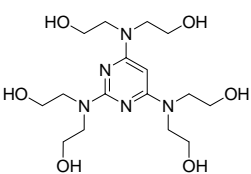
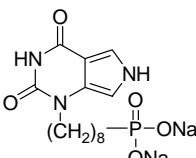
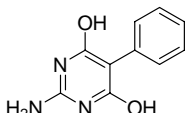
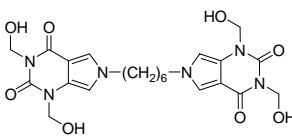
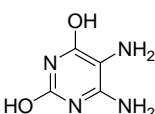
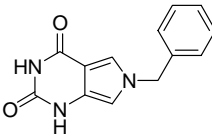
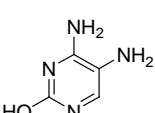
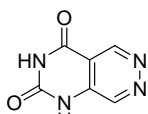
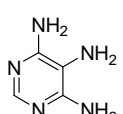
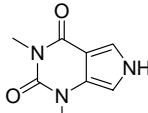
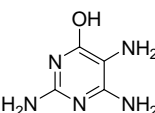
5.1 TEAC

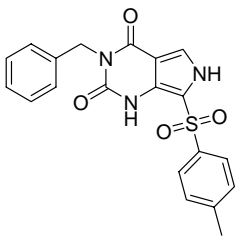
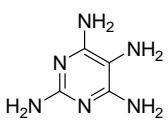
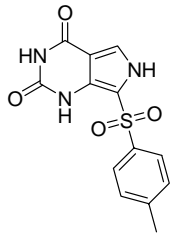
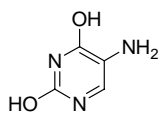
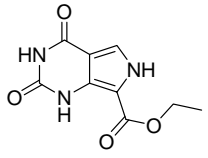
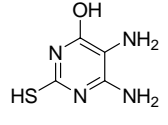
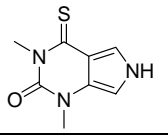
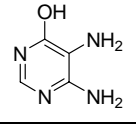
První metodou použitou pro stanovení přímé antioxidační kapacity byla technika TEAC. Takto byla otestována celá série (126 látek) s různými strukturními motivy (kap. 4.2). U látek, které vykazovaly jistou aktivitu při koncentraci 20 μM (pokles absorpance zeleného ABTS radikálu alespoň o 20%), byla změřena koncentrační závislost a byly porovnány směrnice regresních přímků vzorků aktivních látek vůči troloxu (obr. 26). Tento poměr je vyjádřen jako ekvivalenty troloxu (TE). Látky aktivnější než trolox mají antioxidační kapacitu větší než 1 TE (v tabulce IV tučně zvýrazněné).



Obr. 26. Kalibrační křivka troloxu. Na ose y je vyneseno rozdílení absorpance ABTS radikálu před a po přidavku troloxu o výsledné koncentraci uvedené na ose x.

Tabulka IV. Látky, u kterých byla prokázána antioxidační schopnost v TEAC.

Látka	Struktura	TE	Látka	Struktura	TE
4		0,52 ± 0,01	80		0,68 ± 0,02
25		0,46 ± 0,01	82		0,69 ± 0,04
52		1,03 ± 0,02	107		0,71 ± 0,02
57		2,22 ± 0,03	109		0,38 ± 0,01
58		0,64 ± 0,01	111		0,63 ± 0,02
61		0,25 ± 0,01	117		0,27 ± 0,01
63		0,61 ± 0,03	119		0,24 ± 0,01
66		0,43 ± 0,02	120		0,34 ± 0,01
67		1,58 ± 0,03	121		0,32 ± 0,01

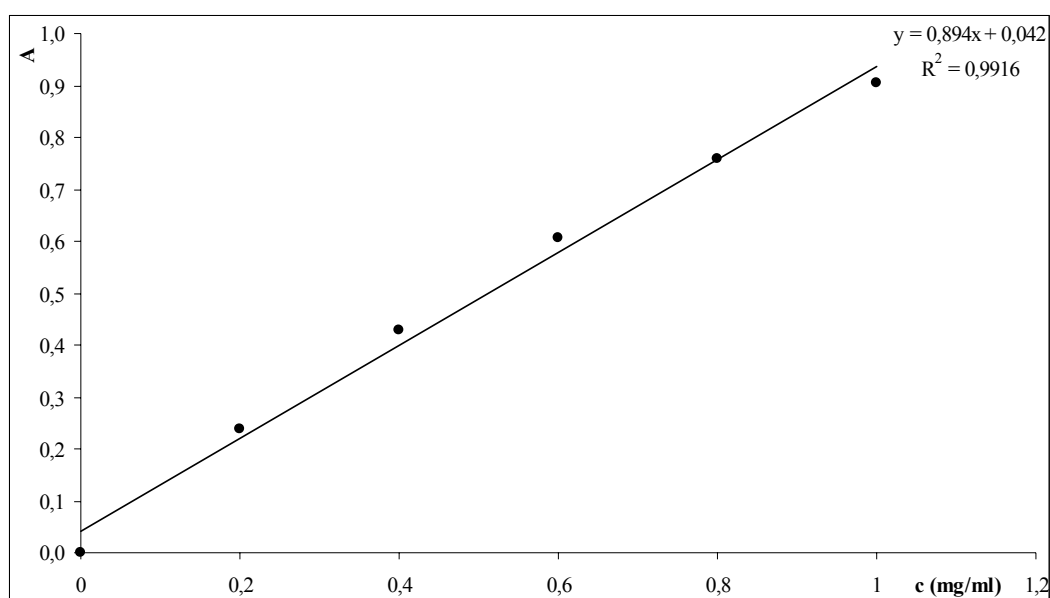
70		$1,18 \pm 0,13$	122		$0,16 \pm 0,01$
71		$1,63 \pm 0,05$	123		$1,21 \pm 0,01$
72		$0,18 \pm 0,03$	124		$0,90 \pm 0,01$
73		$0,27 \pm 0,03$	126		$1,14 \pm 0,01$

Z tabulky IV je patrné, že schopnost zhášet ABTS radikál byla prokázána u více strukturních typů. Obecně lze aktivní látky rozdělit na dvě skupiny a sice látky obsahující –SH nebo =S skupinu a na látky bez atomu síry. Schopnost síry (především právě –SH a =S skupin) přijímat elektrony vyplývá z její snadné oxidovatelnosti na sulfinové a sulfonové kyseliny. U látek bez atomu síry je velmi složité najít jednotný strukturní motiv, který by byl podstatou pozorované aktivity. Za zmínku stojí snad jen 7,9-dideaza-8-azaxanthin (látko 57) a jeho deriváty (58, 61, 63) a dále substituované 5-aminopyrimidiny (117, 119-124, 126). Další skutečnost, která se dá z tohoto experimentu vypožorovat, je ta, že nositeli antioxidační aktivity jsou spíše samotné baze a nikoli analogy nukleosidů, nukleotidů, ani látky nesoucí další objemnější substituenty.

5.2 Vliv studovaných látek na peroxidaci lipidů

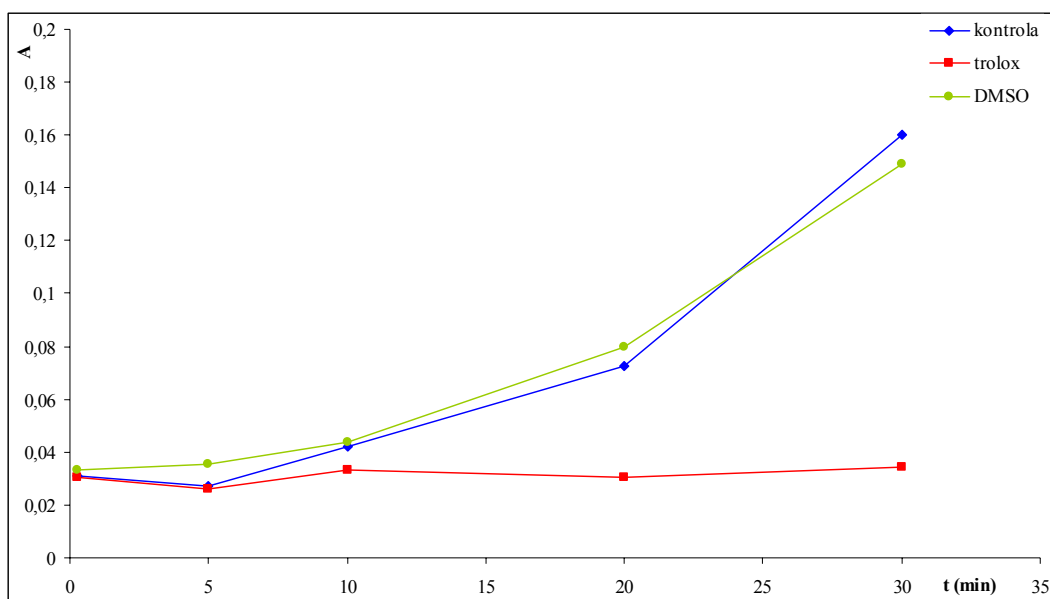
Dále byl monitorován vliv všech 126 látek na proces lipidové peroxidace. Jako zdroj lipidů byly použity mikrosomy izolované z potkaních jater (kap. 4.4).

Byla stanovena jejich koncentrace proteinů metodou BCA (kap. 4.5) pomocí kalibrační křivky standardu proteinu (obr. 27). Jako standard byl použit roztok BSA o koncentraci 0 - 1 mg/ml. Stanovení bylo provedeno ve třech ředěních (10 x, 20 x, 50 x) a výsledky byly zprůměrovány. Hodnota koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena na 5,3 mg/ml.



Obr. 27. Kalibrační křivka roztoků standardu BSA při stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.

Lipidy z mikrosomů byly vystaveny oxidačnímu stresu po empiricky stanovenou dobu 20 min (obr. 28), který byl indukován systémem Fe^{2+} /vzdušný kyslík za přítomnosti askorbátu. Vzniklý malondialdehyd, hlavní produkt lipidové peroxidace, byl detekován po reakci s kyselinou thiobarbiturovou (MDA-TBA adukt) a kvantifikován spektrofotometricky (UV/VIS) a pomocí HPLC-FLD. Antioxidační schopnosti jsou vyjádřeny hodnotou IC_{50} , což je koncentrace, při které klesne peroxidace lipidů na 50% v porovnání se vzorkem bez přítomnosti antioxidantu. Látky nejúčinnější mají hodnotu IC_{50} nejnižší, látky s $\text{IC}_{50} > 100$ uvedené v tabulce V se projevily také jako antioxidačně aktivní, ale až při vyšších koncentracích.

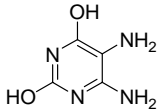
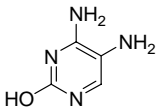
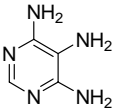
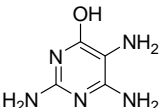
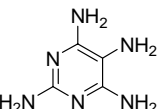
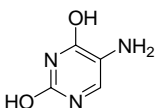
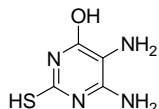
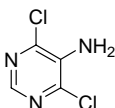
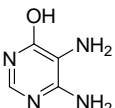


Obr. 28. Optimalizace doby inkubace v procesu peroxidace lipidů. Jako kontrola zde sloužila reakční směs bez látky. Pro vyloučení vlivu DMSO na lipidovou peroxidaci byl připraven vzorek obsahující 1% DMSO. Jako pozitivní kontrola byl použit 20 μ M trolox v 1% DMSO.

Pro samotné stanovení byl vybrán inkubační čas 20 min, kdy už je pozorovatelný rozdíl absorbancí mezi antioxidačně aktivním troloxem a kontrolou.

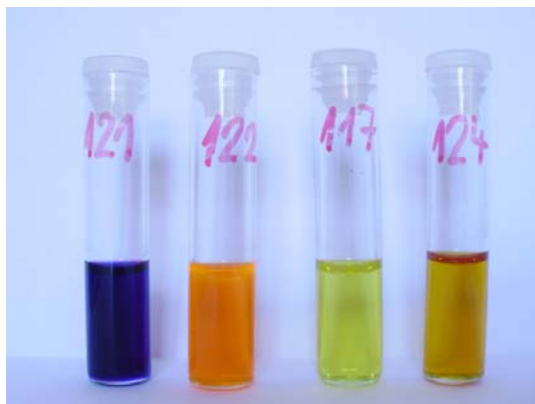
V následující tabulce jsou uvedeny strukturní vzorce všech látek inhibujících proces lipidové peroxidace a příslušné hodnoty IC_{50} získané ze spektrofotometrického stanovení (UV/VIS) a z HPLC-FLD analýzy. Na základě výsledků shrnutých v tabulce V lze konstatovat, že v tomto experimentu je spektrofotometrická detekce ve srovnání s HPLC-FLD srovnatelně přesná.

Tabulka V. Látky s antioxidačními účinky během procesu lipidové peroxidace. Porovnání výsledků získaných různými způsoby detekce, spektrofotometricky (UV/VIS) a pomocí HPLC-FLD.

Vzorek	Struktura	IC ₅₀ (μM) dle UV/VIS	IC ₅₀ (μM) dle HPLC-FLD
117		55	45
119		>100	>100
120		>100	>100
121		10	13
122		15	24
123		>100	>100
124		26	46
125		>100	>100
126		>100	>100

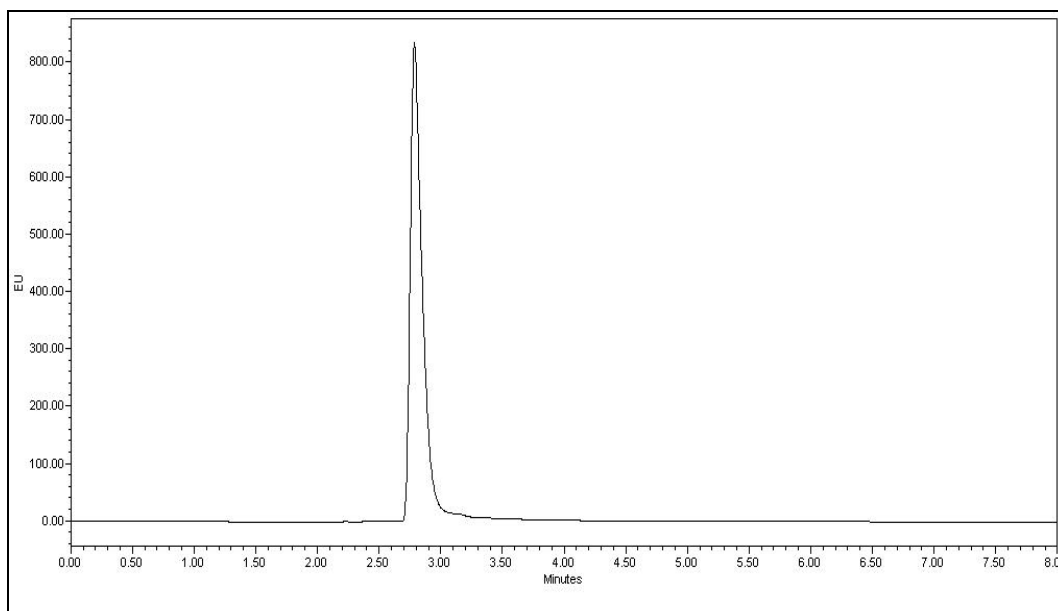
Všechny testované látky uvedené v tabulce V inhibují proces lipidové peroxidace, nejúčinnější z nich spadají do skupiny 2,4-disubstituovaných 5,6-di-aminopyrimidinů. Nejúčinnější látka (121) je již popsána v literatuře [128], kde se uvádí, že pro antioxidační účinek je klíčová aminoskupina v poloze 5 a hydroxylová skupina v poloze 4 na pyrimidinu. Podle našeho pozorování je však důležitá přítomnost čtyř elektrondonorních substituentů na pyrimidinovém kruhu a sice v polohách 2, 4, 5 a 6 a zároveň přítomnost aminoskupin v polohách 5 a 6.

U derivátů 2,4-disubstituovaného 5,6-diaminopyrimidinu byla pozorována velmi výrazná barevná změna zásobního 10 mM roztoku v DMSO v čase (obr. 29).

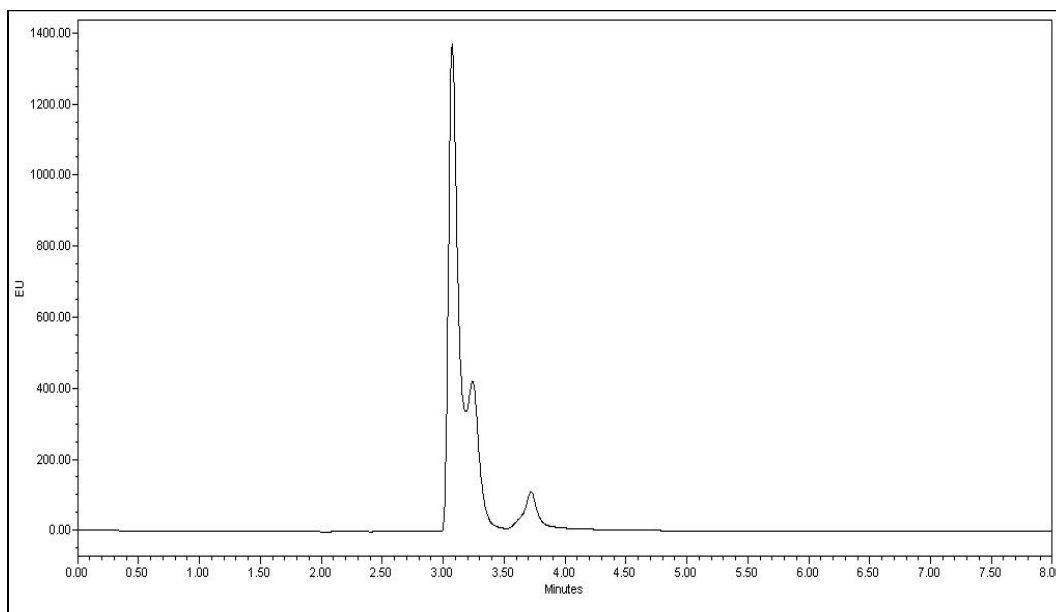


Obr. 29. 10 mM roztoky látek 121, 122, 117 a 124 v DMSO po třech dnech za laboratorní teploty (na počátku v čase 0 bezbarvé).

Na jejich pravděpodobný rozklad poukazoval také pokles antioxidační aktivity v opakovaném experimentu ze stejného zásobního roztoku i kvalitativní změna signálu v HPLC chromatogramu (obr. 30, 31). Nejvýraznější změna odezvy detektoru byla patrná u látky 122 uchovávané jako 10 mM roztok v DMSO při 4 °C (obr. 31).

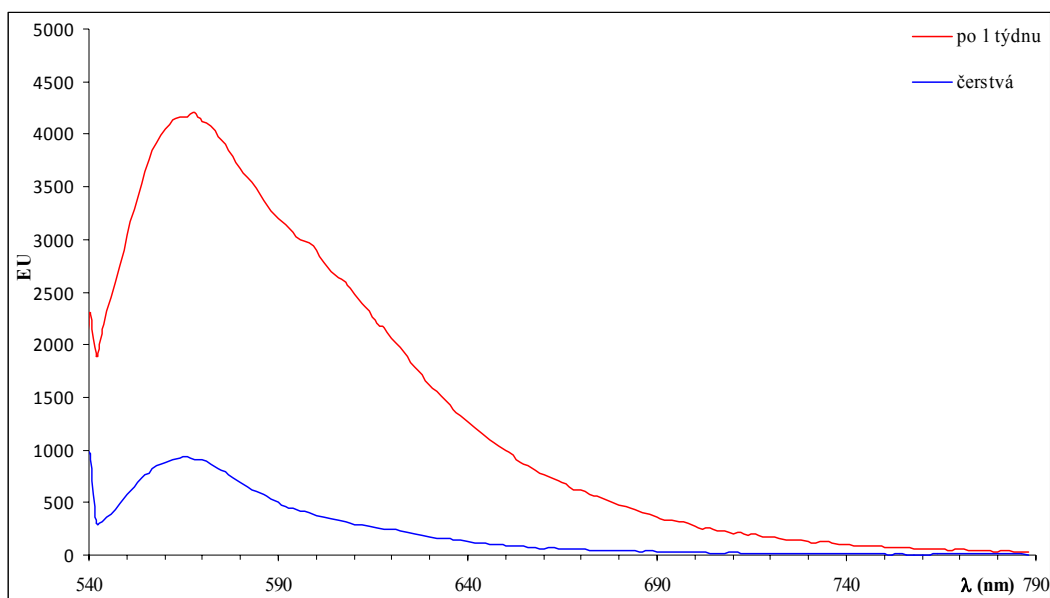


Obr. 30. Chromatogram z HPLC analýzy. Signál s retenčním časem u 3 min odpovídá MDA-TBA aduktu, který po excitaci (532 nm) emituje záření o vlnové délce 553 nm. Záznam z analýzy antioxidační aktivity látky 122, čerstvě navážené.



Obr. 31. Chromatogram z HPLC analýzy. Podmínky měření byly stejné jako u obr. 30, s použitím 1 týden starého roztoku látky 122, který byl uchován při 4 °C.

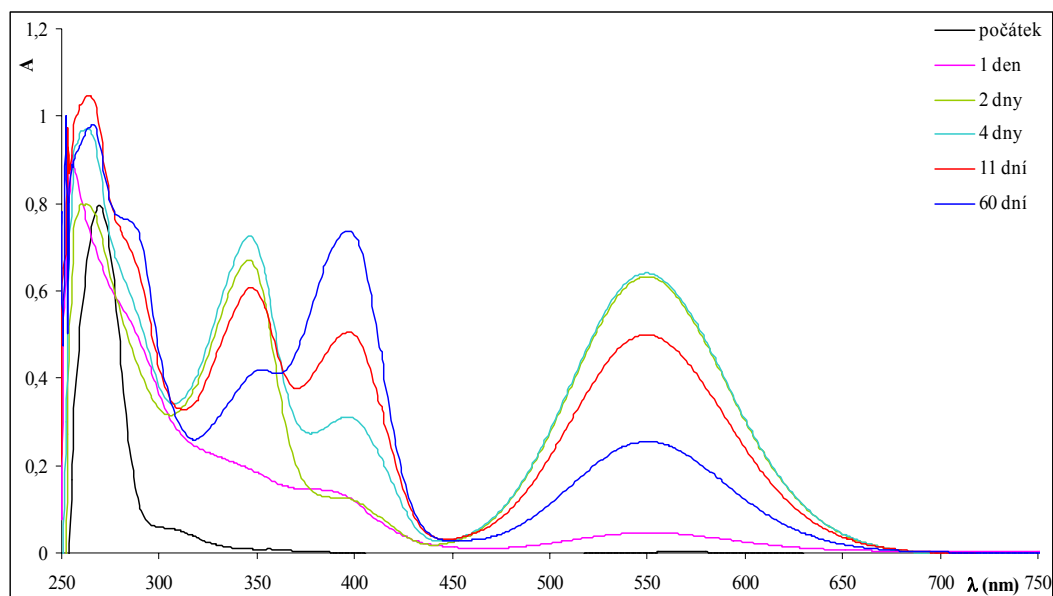
Pomocí HPLC-FLD bylo možné pozorovat signál za majoritním píkem. Ten by mohl odpovídat signálu produktu rozpadu látky 122. Emisní spektrum, které potvrzuje přítomnost fluoreskujícího produktu při daných vlnových délkách, je zobrazeno na obr. 32.



Obr. 32. Emisní spektrum látky 122 v DMSO měřené při excitační vlnové délce 532 nm. Vzorek látky 122 byl změřen hned po rozpuštění a po 1 týdnu za laboratorní teploty.

5.3 Studium rozpadu derivátů 5,6-diaminopyrimidinu

Na základě pozorování pouhým okem viditelných barevných změn roztoků látek a z analýzy naměřených chromatogramů bylo zcela evidentní, že látky s nejvýraznějším antioxidačním efektem se přeměňují pravděpodobně působením DMSO nejrychleji. A vzhledem k tomu, že tato přeměna může nepříznivě ovlivňovat vlastní stanovení, bylo velmi zajímavé zabývat se identifikací produktů rozpadu a případně mechanismem jejich vzniku. U celé série studovaných 5-amino-pyrimidinů byla sledována jejich přeměna v DMSO pomocí UV/VIS spektrofotometrie v čase. U látek 119, 120, 123, 125 a 126 byly pozorovány velmi nepatrné změny v absorpčních spektrech v průběhu dvou měsíců, ale u látek 121, 122, 117 a 124 byly změny v absorpčních spektrech výraznější a rychlejší. Zároveň byly tyto čtyři látky antioxidačně nejaktivnější. Bylo zjištěno, že k přeměnám látek dochází rychleji ve formě koncentrovanějších roztoků. Absorpční spektra čtyř nejaktivnějších látek jsou znázorněna na obr. 33-36.

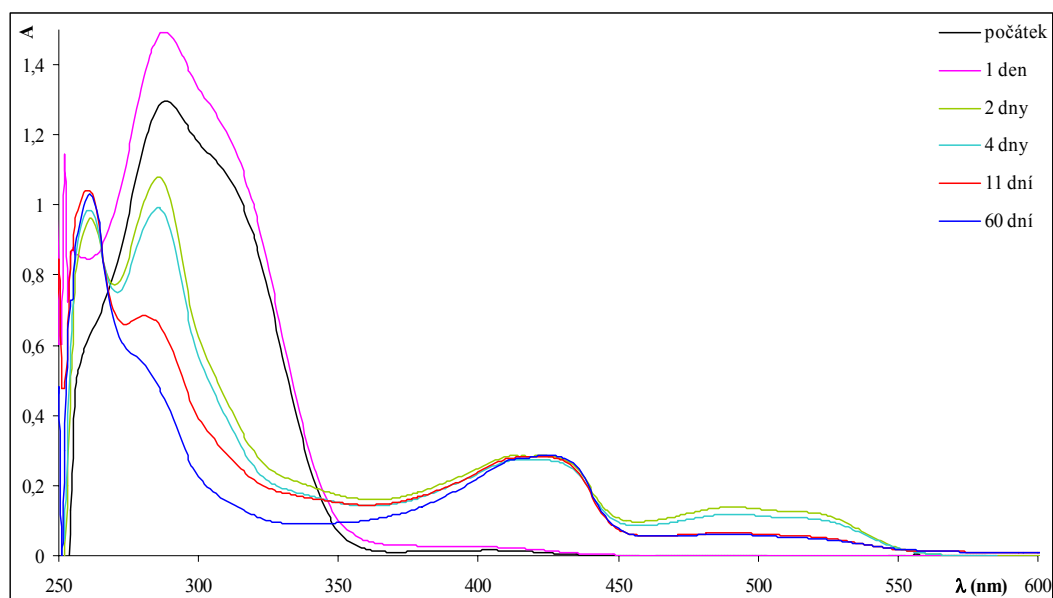


Obr. 33. Absorpční spektrum látky 121 měřené jako 0,2 mM roztoky v DMSO v různých časových intervalech od přípravy vzorku. Uchováno při laboratorní teplotě.

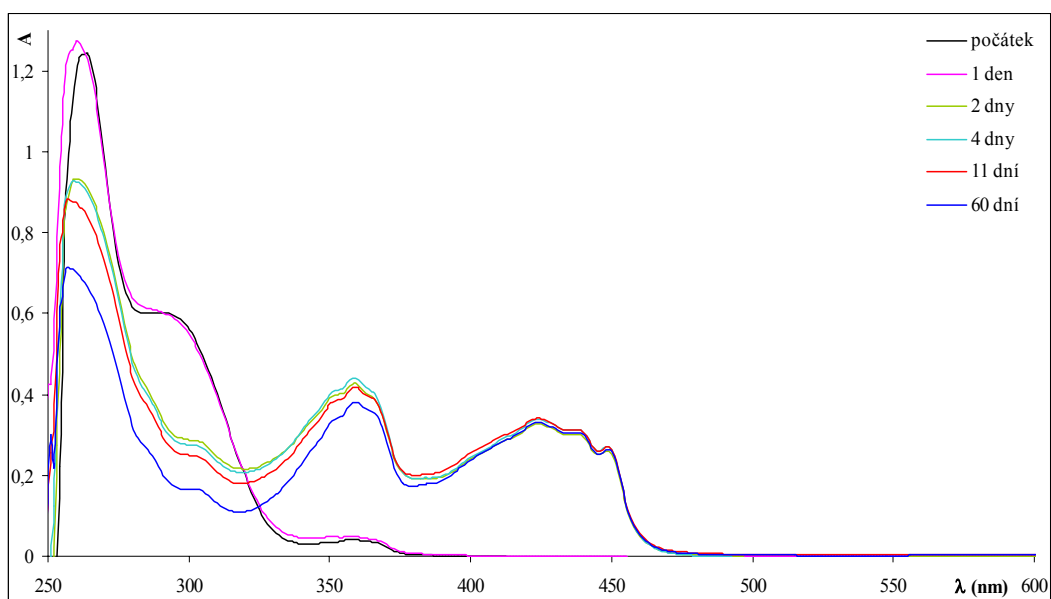
V obr. 33 je jasně patrný vzrůst absorpance při vlnové délce 550 nm a tedy i výrazná barevná změna. Prvních 24 h nejsou pozorovatelné výrazné změny ve spektru, ale už v čase dva dny lze pozorovat lokální maxima u hodnot vlnových

délek 347 a 550 nm. Hodnoty absorpance při těchto vlnových délkách však postupem času klesají a objevuje se nové lokální maximum při vlnové délce 397 nm. Z těchto změn spekter lze předpokládat vznik meziprojektu, který dále reaguje na konečný produkt. Průběh reakce lze pozorovat pouhým okem. Původně bezbarvý roztok se nejprve promění v temně fialový a po delší době zežloutne.

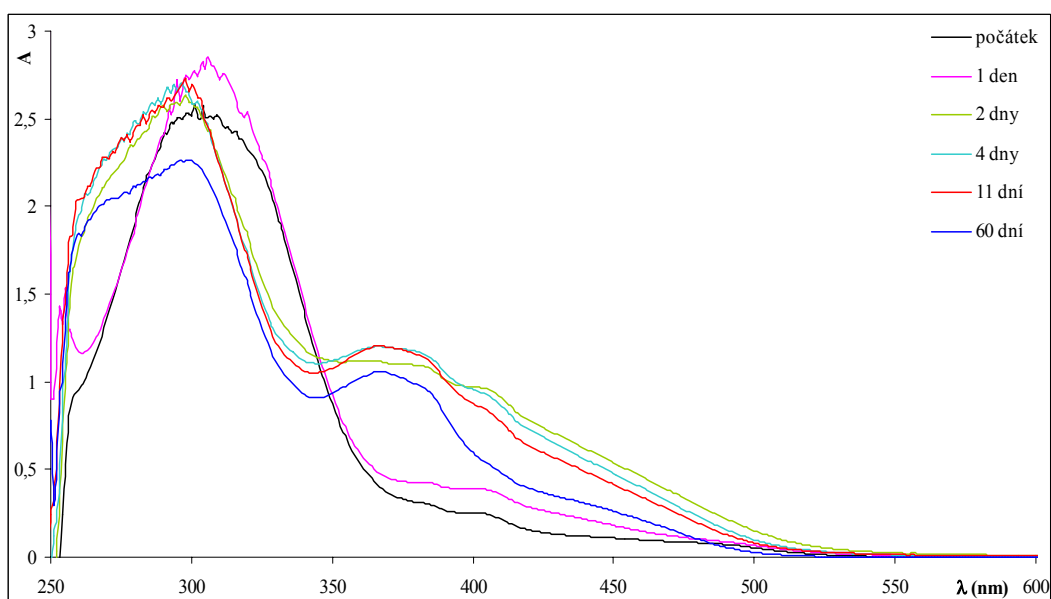
V absorpčních spektrech látky 122 (obr. 34) už nelze pozorovat ostré lokální maximum ve viditelné oblasti jako v předchozím případě. Ale spektra jsou si navzájem podobná svým časovým vývojem. První den po rozpuštění ještě k žádné výraznější změně nedochází, ale v čase dva dny už je možné pozorovat vznik lokálních extrémů ve viditelné oblasti. To je analogické pro všechny čtyři aktivní látky, jak je ukázáno v následujících obrázcích (obr. 34-36).



Obr. 34. Absorpční spektrum látky 122 měřené jako 0,2 mM roztoky v DMSO v různých časových intervalech od přípravy vzorku. Uchováno při laboratorní teplotě.



Obr. 35. Absorpční spektrum látky 117 měřené jako 0,2 mM roztoky v DMSO v různých časových intervalech od přípravy vzorku. Uchováno při laboratorní teplotě.

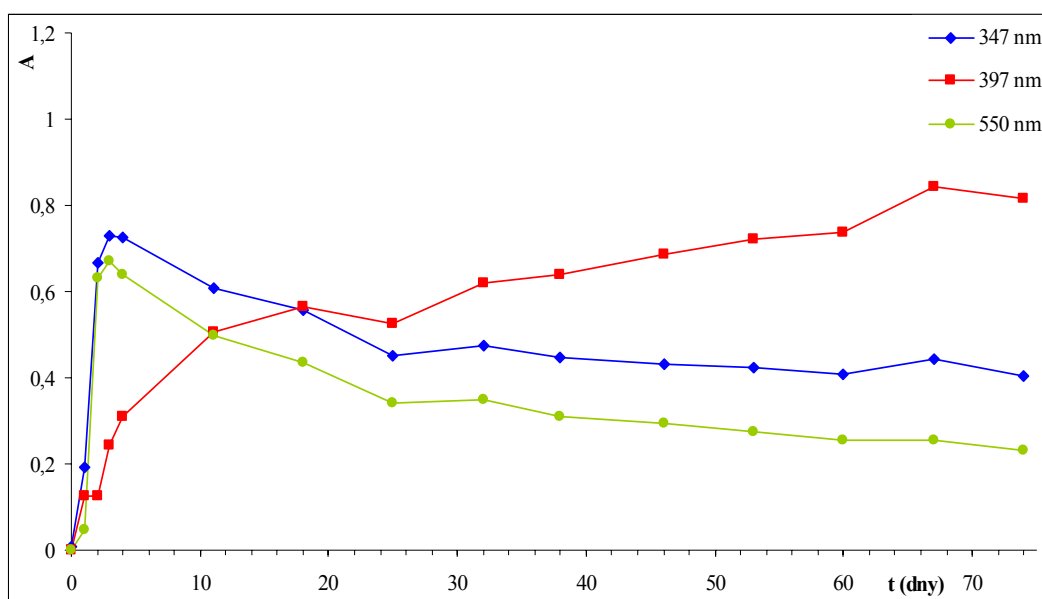


Obr. 36. Absorpční spektrum látky 124 měřené jako 0,2 mM roztoky v DMSO v různých časových intervalech od přípravy vzorku. Uchováno při laboratorní teplotě.

Předchozí čtyři obrázky (33-36) ukazují, že roztoky látek 121, 122, 117 a 124 v DMSO, které zároveň mají největší antioxidační aktivitu, podléhají reakcím, následkem kterých dochází ke snížení koncentrace aktivních látek. Dále jsme se zabývali pouze látkou 121, jejíž změna spektra ve viditelné oblasti je v průběhu přeměn nejvýraznější.

5.3.1 Vliv teploty

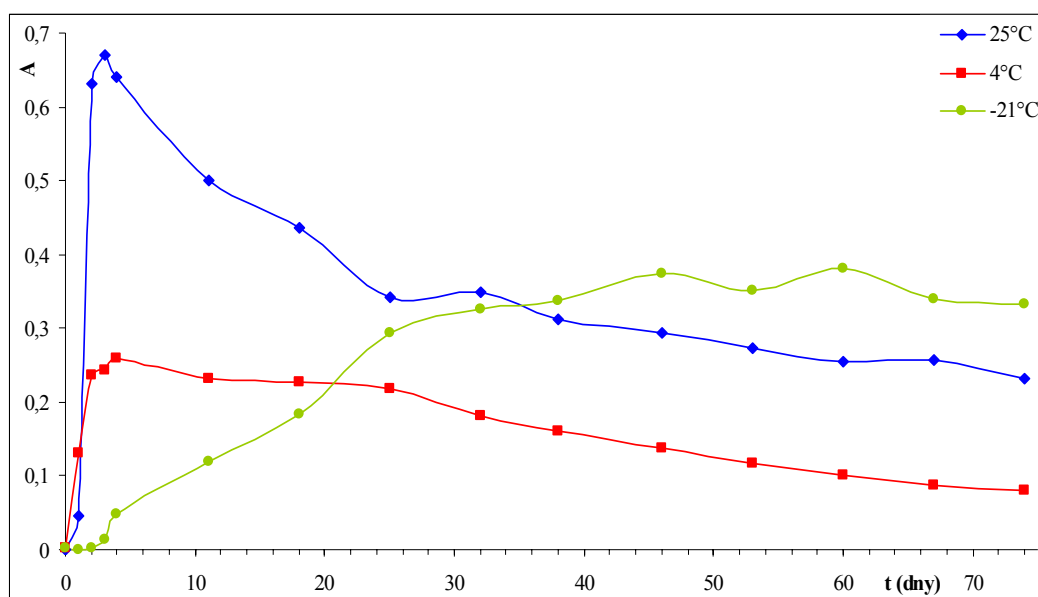
Bylo zjištěno, že rychlost rozkladu je závislá na teplotě. Roztoky byly skladovány při třech různých teplotách (25 °C, 4 °C a -21 °C) a byl sledován průběh reakce v čase řádů dnů. Nejrychleji probíhala reakce při laboratorní teplotě 25 °C. V absorpčním spektru byla pozorována tři absorpční maxima při vlnových délkách 347, 397 a 550 nm (obr. 37).



Obr. 37. Závislost absorbance látky 121 při vlnových délkách absorpčních maxim meziproduktu (347 a 550 nm) a konečného produktu rozkladu (397 nm) na čase při teplotě uchování 25 °C.

Z uvedeného obrázku je patrné, že velmi rychle narostou signály při vlnových délkách 347 nm a 550 nm. Zhruba po třech dnech však začnou klesat a současně začne vznikat produkt s absorpčním maximem při vlnové délce 397 nm. Velmi podobný průběh reakce lze sledovat i při teplotě 4 °C. Ale u vzorku uloženého při -21 °C probíhá reakce výrazně pomaleji a i po 60 dnech stále roste absorbance při vlnových délkách 550 a 347 nm.

Na obr. 38 je vynesena časová závislost absorbance při vlnové délce 550 nm pro tři různé teploty.

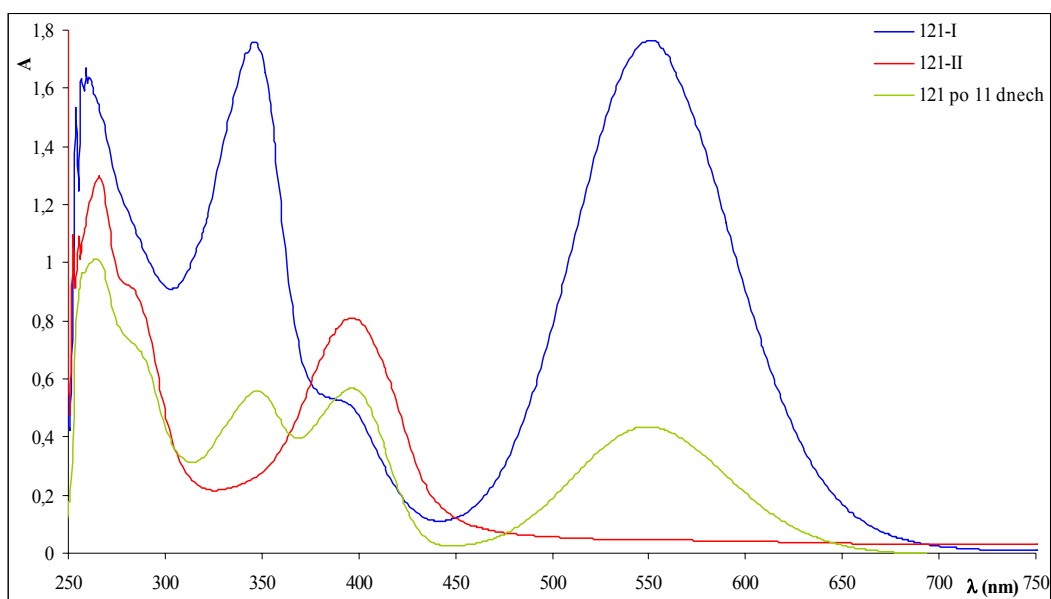


Obr. 38. Vliv teploty na rychlost rozpadu látky 121 a vznik produktu s absorpčním maximem 550 nm.

5.3.2 Izolace produktů rozpadu

Z průběhu absorpčních spekter vyplývá, že přeměnou výchozí látky 121 vzniká jeden meziprodukt (121-I), který se dále přeměňuje na konečný produkt reakce (121-II). Tyto dvě látky se podařilo z reakční směsi izolovat a jejich UV/VIS spektra byla porovnána se spektrem reakční směsi (obr. 39).

Naměřená absorpční spektra dvou izolovaných produktů se shodují se spektry, která byla naměřena během rozkladu látky 121. 121-I se dvěma absorpčními maximy při vlnových délkách 347 a 550 nm dále reaguje na 121-II s maximem při vlnové délce 397 nm, jak je patrné na obr. 39.



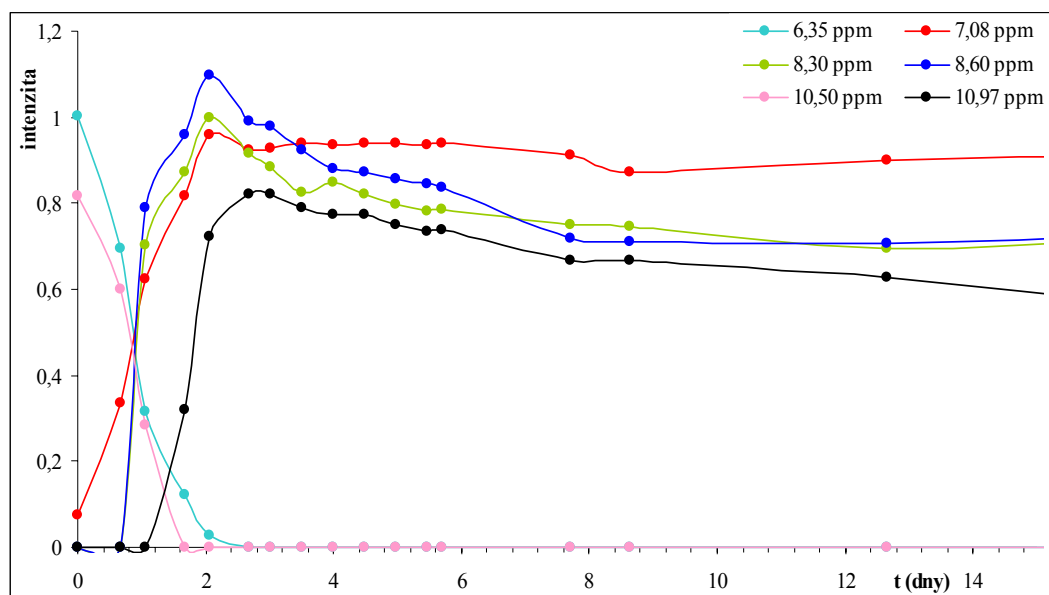
Obr. 39. Absorpční spektrum látky 121 a jejích produktů rozkladu 121-I a 121-II měřené jako 0,2 mM roztoky v DMSO. Vzorek 121 byl uchován 11 dní při laboratorní teplotě.

5.3.3 Kinetika rozpadu látky 121 pomocí NMR

Kinetika rozpadu látky 121 byla paralelně sledována pomocí NMR spektroskopie. Výchozí látka 121 má v ^1H NMR spektru signály u 10,50 ppm (amidové NH) a 6,35 ppm (NH_2). Krátce po rozpuštění (do 48 h) se ve spektru objevuje signál u 7 ppm, který je rozštěpen na tři linie o stejné intenzitě s interakční konstantou 51 Hz. Tento signál odpovídá amonnému kationtu. Intenzita tohoto signálu postupně vzrůstá, dokud nedosáhne svého maxima a dále se nemění.

Rychlost reakce sledovaná pomocí NMR spektroskopie se shoduje s údaji získanými z UV/VIS spektrofotometrie. Velmi cennou informací navíc byla přítomnost charakteristického signálu amonného kationtu v NMR spektru při chemickém posunu u 7 ppm (obr. 40).

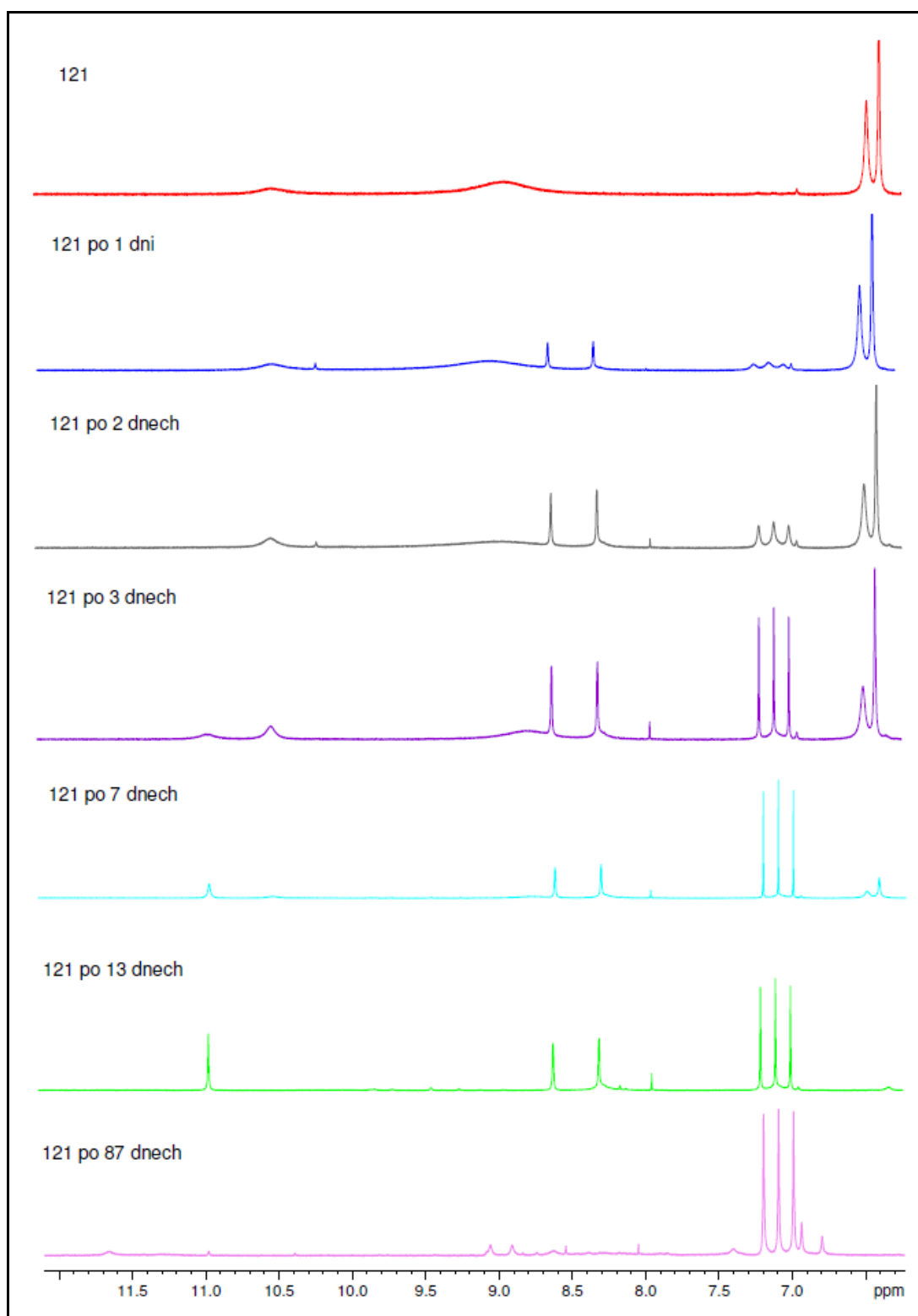
Průběh reakce byl pomocí NMR sledován po dobu zhruba tří měsíců, ale pro přehlednost byla do grafu zaznamenána reakce pouze v průběhu prvních 14 dnů. Intenzita signálu amonného kationtu (7,08 ppm) byla po 3 dnech v čase konstantní, intenzita signálů meziprojektu 121-I (8,30; 8,60; 10,97 ppm) klesala.



Obr. 40. Vývoj NMR signálů látky 121 v čase, signál 6,35 ppm (NH_2 skupiny látky 121), 10,50 ppm (NH-skupiny látky 121), 7,08 ppm (NH_4^+), 8,30 a 8,60 ppm (NH_2 skupiny látky 121-I), 10,97 ppm (NH skupiny látky 121-I).

Je však nutné konstatovat, že kinetika reakce sledovaná pomocí NMR není tak přesná, jako UV/VIS spektrofotometrie. Produkty rozpadu obsahují pouze atomy vodíku, které se mohou vzájemně vyměňovat, tzv. vyměnitelné vodíky, což způsobuje rozšíření signálů. Navíc kvůli nízké rozpustnosti látky 121 nebyla její koncentrace dostatečná pro získání přesných hodnot intenzit NMR signálů. U některých z nich dochází také k překryvům a to vede k nepřesné integraci.

Pro ilustraci je na obr. 41 zobrazen vývoj ^1H NMR spekter ve vybraných časových intervalech. Úplně vpravo na prvním spektru (červené) je patrný signál výchozí látky 121 (6,35), který v průběhu času mizí a objevují se nové signály látky 121-I při hodnotách chemických posunů 8,30 a 8,60. Ty v průběhu času opět mizí – látka 121-I se přeměňuje na 121-II. Signály látky 121-II jsou viditelné okolo 7,4, 9,0 a 11,7 ppm, jejich intenzita je však velmi malá a to pravděpodobně z důvodu vysrážení této látky z roztoku.

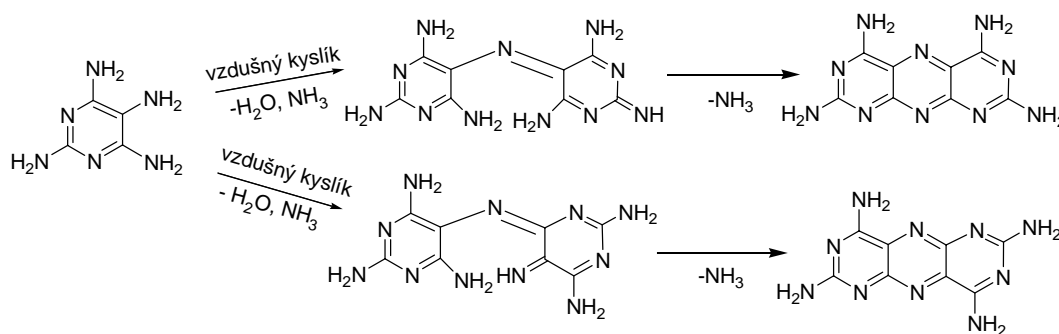


Obr. 41. ^1H NMR spektra látky 121 v čase. NMR spektrum látky 121 hned po rozpuštění v DMSO je znázorněno červeně (121). Již po dvou dnech se objevuje velmi výrazný signál amonného kationtu (7,08 ppm) současně se signály látky 121-I (8,30 a 8,60 ppm). Po 87 dnech signály látky 121-I vymizí, vzniká konečný produkt 121-II, jehož signály se objevují u 7,4, 9,0 a 11,7 ppm.

5.3.4 Návrh reakčního mechanismu

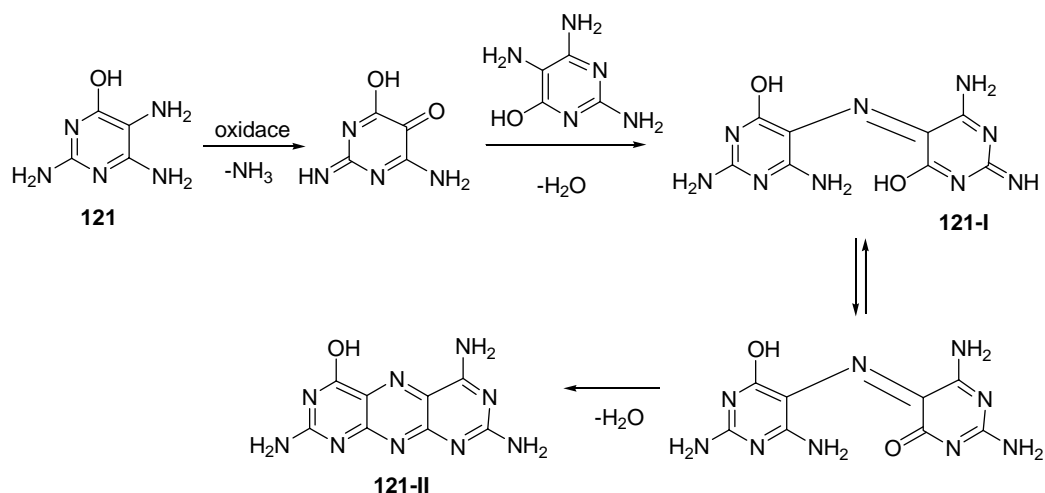
V literatuře je popsána schopnost diaminopyrimidinů kondenzovat sami se sebou za přítomnosti kyslíku [129]. Autoři vycházeli z 2,4,5,6-tetraaminopyrimidinu (odpovídá látce 122 z naší studie), který byl oxidován vzdušným kyslíkem, a byly vyizolovány dva barevné produkty se sumárním vzorcem $C_8H_8N_{10}$. Pouze na základě reaktivity produktů sledem chemických reakcí byly identifikovány oba izomery (obr. 42) a popsán mechanismus této oxidace.

Nejprve dochází k oxidaci 5-aminoderivátu na 5-oxoderivát za současného uvolnění amoniaku a následné kondenzaci s další molekulou výchozí látky za vzniku barevného produktu a současného odštěpení vody. Ten následně podléhá intramolekulární cyklizaci, jejíž produktem je stabilní derivát pyrimidopterinu.



Obr. 42. Oxidace 2,4,5,6-tetraaminopyrimidinu vzdušným kyslíkem za vzniku dvou barevných produktů přes vznik meziproduktů, upraveno podle [129].

Vzhledem ke strukturní analogii testovaných látek s těmi popsány v literatuře jsme předpokládali, že mechanismus oxidace látky 121 a produkty reakce budou podobné. Dva izolované produkty 121-I (fialový) a 121-II (žlutý) byly charakterizovány hmotnostní spektrometrií. Byla změřena hmotnostní spektra s vysokým rozlišením (ESI-HRMS) a z nich bylo určeno sumární složení látky 121-I $C_8H_9N_9O_2$ a 121-II $C_8H_7N_9O$. V ESI-MS spektrech byla pozorována fragmentace molekulových iontů odpovídající ztrátě H_2O a NH_3 . Na základě těchto informací byl navržen mechanismus oxidace a struktura produktů 121-I a 121-II (obr. 43). Oba produkty byly dále analyzovány pomocí NMR spektroskopie a počet i poloha signálů v 1H i ^{13}C spektrech korespondovala s navrhovanými strukturami.



Obr. 43. Schéma oxidace látky 121 na 121-I a 121-II.

Pomocí výše uvedeného obrázku lze shrnout získané informace z předchozích experimentů. Podle absorpčních spekter víme, že vznikají dva produkty oxidace a sice 121-I a 121-II. Díky NMR kinetickému měření bylo zjištěno, že se během první reakce uvolňuje amoniak a dá se předpokládat, že rychlost této oxidační reakce je klíčová pro reakce následné a mohla by tedy být klíčová i při hodnocení antioxidačních vlastností. Jestliže se látka ochotně oxiduje, je pravděpodobné, že bude mít výraznější antioxidační vlastnosti než látka stabilnější.

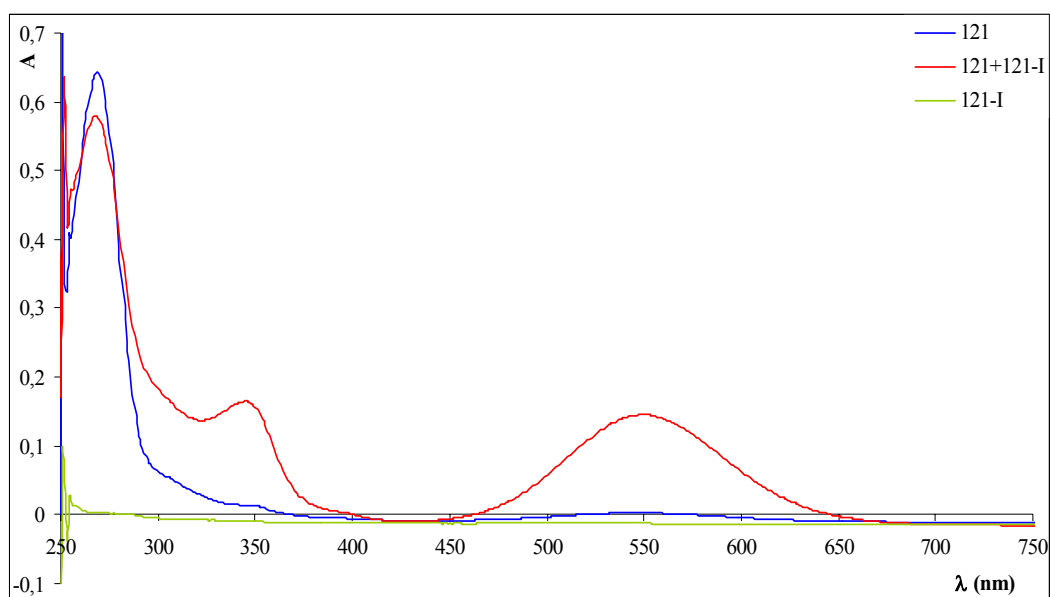
5.3.5 Vliv prostředí na kondenzaci látky 121

Za účelem potvrzení oxidace látky působením DMSO bylo sledováno chování látky 121 ještě v dalších rozpouštědlech. Kriteériem pro výběr rozpouštědla byla především rozpustnost látek. Methanol, ethanol, ether a aceton látku nerozpouštěly, zatímco *N,N*-dimethylformamid (DMF) a *N*-methylpyrrolidinon (NMP) ano. V obou posledně zmíněných rozpouštědlech roztoky pouze lehce zružověly a dále už přeměně nepodléhaly, barva se neměnila. Toto je možné vysvětlit přítomností malého množství vzdušného zbytkového kyslíku v roztoku a také faktem, že tato rozpouštědla nemají ani slabé oxidační schopnosti, přestože jsou dipolární aprotická a obsahují atom kyslíku, stejně jako DMSO.

I v případě, kdy byl DMSO nasycen argonem, bylo možné pozorovat oxidační rozklad na 121-I, při experimentu provedeném ve větším množství byl velmi výrazně cítit charakteristický zápach dimethylsulfanu, který se uvolňoval v průběhu redukce DMSO. Dále byl prozkoumán vliv prostředí na reaktivitu látky 121.

Z předcházejících měření bylo překvapivě zjištěno, že rychlost tvorby 121-I není konstantní ve smyslu pseudoprvního řádu. Během prvních 24 h nevznikl téměř žádný meziprodukt 121-I a poté během 2 dnů došlo ke vzniku velkého množství produktu. To by mohlo znamenat, že by 121-I mohlo vznikat mechanismem autokatalýzy.

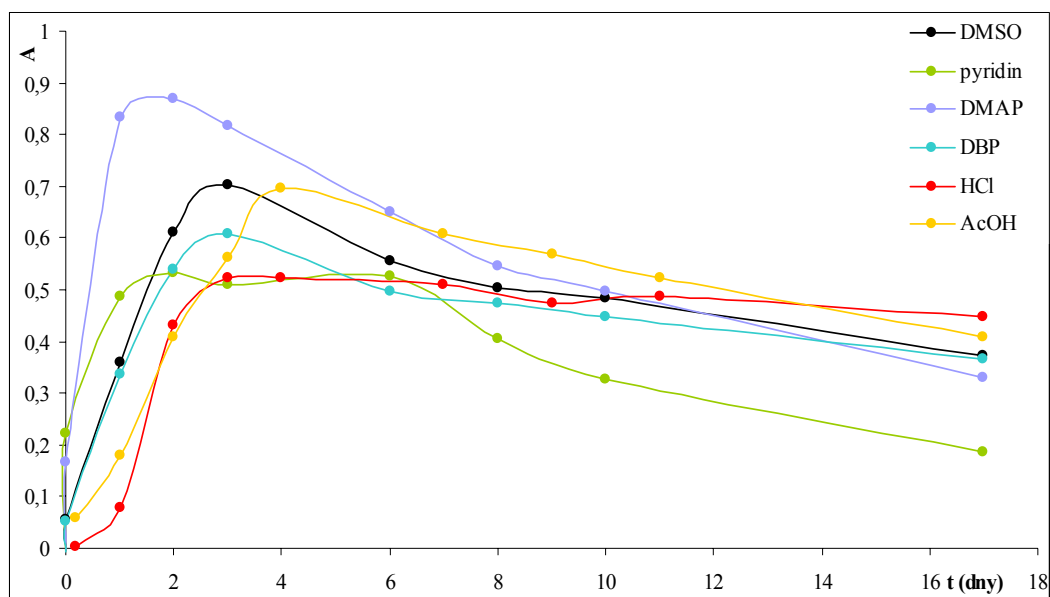
Proto byl proveden další experiment, aby se tento předpoklad potvrdil. Byl připraven 10 mM roztok látky 121 v DMSO s přídavkem katalytického množství 121-I (121+121-I, výsledná koncentrace 121-I 2 μ M), pro porovnání sloužil 10 mM roztok látky 121 v DMSO bez 121-I. Jako pozadí byl měřen roztok 121-I (výsledná koncentrace 2 μ M), bez látky 121 (obr. 44). Po 5 h od přípravy roztoků byla zaznamenána jejich absorpční spektra. Tímto experimentem byla jednoznačně potvrzena autokatalýza při vzniku produktu 121-I. Naměřené spektrum pro 121+121-I vykazuje mnohonásobně větší množství látky 121-I než bylo dodáno katalytickým přídavkem. Jinými slovy, naměřené spektrum pro 121+121-I není pouhým součtem absorbancí 121 a 121-I, ale je patrný dramatický nárůst absorbancí charakteristických pro 121-I.



Obr. 44. Potvrzení autokatalytické oxidace a následné kondenzace látky 121. Porovnání absorpčního spektra 10 mM roztoku látky 121 se vzorkem 10 mM roztoku látky 121 s přidavkem katalytického množství 121-I po 5 h od rozpuštění za laboratorní teploty.

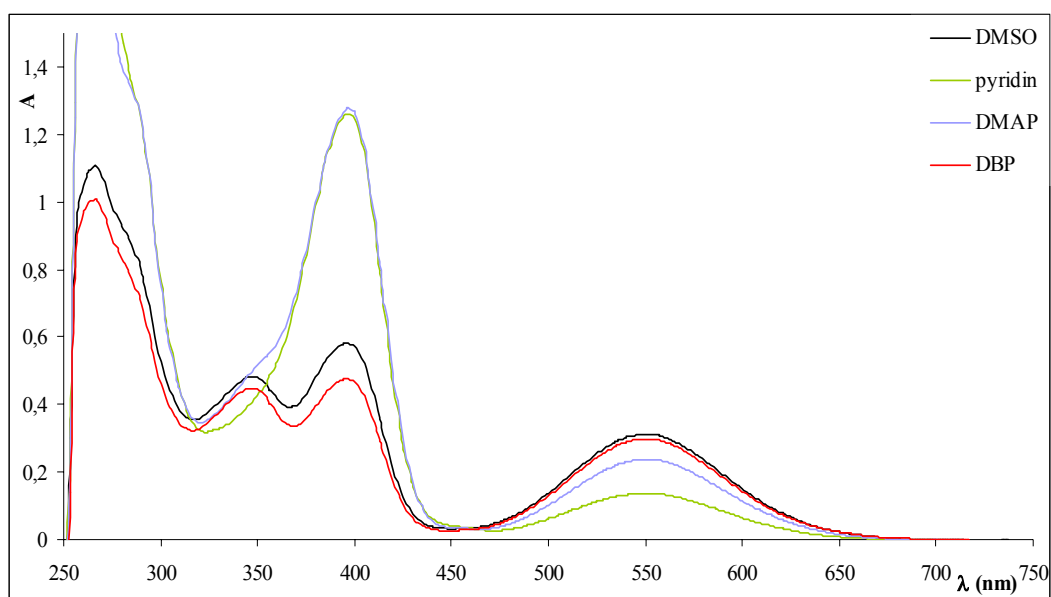
Jak již bylo popsáno výše a ukázáno na reakčním schématu, prvním krokem je oxidace a vznik ketoiminu za současného odštěpení amoniaku. Následující reakce je kondenzační, uvolňuje se molekula vody a produktem jsou iminy. Ty vznikají s největší pravděpodobností mechanismem nukleofilní adice, kdy se primární amin aduje na aldehyd nebo keton za vzniku tzv. Schiffovy báze [130]. Oxoskupina je pravděpodobně vytvořena působením DMSO na látku 121 (obr. 43) a na ní se aduje aminoskupina v poloze 5 druhé molekuly 121. Jak je známo, průběh kondenzačních reakcí je značně závislý na pH. Aby však byly zachovány původní podmínky rozkladných reakcí, nebyla reakce převedena do vodného prostředí a tudíž nebylo možné stanovit pH závislost. Proto byl ověřen pouze vliv přidavku kyselin a bází k 10 mM roztoku látky 121 v DMSO.

K 10 mM roztokům 121 v DMSO byly přidány 3 ekvivalenty báze resp. kyseliny. Působení různých přísadků bylo porovnáno s kontrolou (10 mM roztok 121 v DMSO). Byla vynesena časová závislost absorbance při vlnové délce 550 nm (obr. 45). Tento průběh byl sledován po dobu jednoho měsíce, ale pro přehlednost je v grafu vyneseno pouze prvních 17 dní. Současně byl vyzkoušen i vliv amoniaku a triethylaminu, ale po přidavku těchto dvou bází došlo k vysrážení výchozí látky z roztoku.



Obr. 45. Vliv přidavku báží resp. kyselin na vznik fialového produktu 121-I. Černá křivka znázorňuje látku 121 rozpuštěnou v DMSO bez přidavku báze resp. kyseliny. DMAP = 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin, DBP = 2,6-di-*tert*-butylpyridin, AcOH = kyselina octová.

Na základě naměřené závislosti lze pozorovat rozdílný vliv přidaných báží pyridinu, 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridinu (DMAP) a 2,6-di-*tert*-butylpyridinu (DBP) resp. kyselin – HCl, kyselina octová (AcOH) na průběh reakce. Po přidavku AcOH byl pozorován vznik fialového meziproduktu 121-I až o den později, než tomu bylo u DMSO. Působením přidavku HCl nedocházelo k velkému nárůstu 121-I, ani k jeho přeměně na žlutý 121-II, a to ani po měsíci za laboratorní teploty. Pravděpodobně se uplatnil vliv protonace látky 121, která byla navíc připravena ve formě hydrogensulfátu. Dále bylo pozorováno, že působením některých báží (DMAP) dochází k prudkému nárůstu fialového produktu 121-I již během prvního dne a k rychlejší přeměně na konečný žlutý produkt 121-II. Podobně se v přeměně na 121-II chová pyridin. Jen DBP, zdá se, nedovoluje rychlou přeměnu 121 na 121-I v takovém rozsahu a v reakční směsi i po 24 dnech převažuje fialový 121-I nad žlutým 121-II (obr. 46).



Obr. 46. Absorpční spektrum látky 121 po přidavku různých bází po 24 dnech stání za laboratorní teploty.

Bazicita použitých bází klesá v pořadí DMAP > DBP > pyridin. Z hlediska jejich nukleofility je tomu však jinak. Nejvíce nukleofilní je DMAP, méně pyridin a téměř vůbec DBP. Z naměřených dat je tedy patrné, že reakce není katalyzovaná bazicky, ale nukleofilně. Vlivem nukleofilních bází pyridinu a DMAP vzniká po 24 dnech velké množství konečného žlutého produktu 121-II (absorpční maximum při 397 nm). DBP, který ze sterických důvodů nukleofilní vlastnosti nemá, průběh reakce neovlivňuje a nepodporuje vznik konečného produktu. Tato zjištění o nukleofilní katalýze korespondují i s výše uvedeným zjištěním, že látka 121-I vykazuje schopnost katalyzovat reakci vedoucí ke svému vzniku (autokatalýza). Iminový dusík látky 121-I nesoucí jeden elektronový pár (obr. 43), který není zapojen do rezonance s oběma pyrimidinovými kruhy, je schopen studovanou reakci nukleofilně katalyzovat.

Na základě výše uvedených skutečností je zřejmé, že DMSO není vhodný jako rozpouštědlo při hodnocení antioxidačních vlastností studovaných látek, přestože se dnes velmi hojně používá. Jeho časté používání pro tyto účely je velmi zářející vzhledem ke skutečnosti, že jsou popsány jeho oxidační schopnosti a jeho používání může zkreslovat výsledky. V organické chemii je tato vlastnost DMSO dobře známá a využívána při oxidaci alkoholů na aldehydy. Tato reakce se nazývá Swernova oxidace [131].

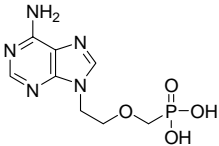
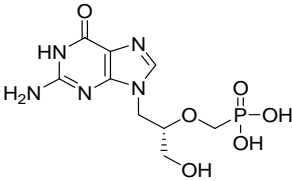
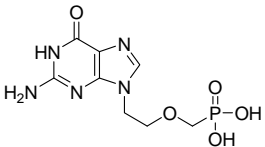
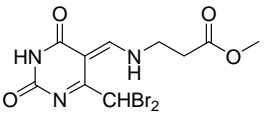
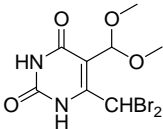
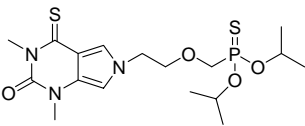
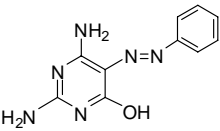
Výsledky sledování vlivu látek na proces lipidové peroxidace byly konfrontovány s literaturou [128]. Hodnota IC_{50} látky 121 byla v literatuře stanovena na 55 μM , v našich experimentech však byla nalezena hodnota kolem 10 μM . Tento rozdíl by mohl být způsoben právě oxidačním působením DMSO, protože stejných hodnot IC_{50} lze dosáhnout při použití testované látky ve formě několik dní starého roztoku v DMSO.

5.4 Stanovení ROS na buněčné úrovni

Pro stanovení antioxidační aktivity látek na buněčné úrovni byla jako model zvolena buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu Hep G2. V buňkách byl generován oxidační stres působením 1 mM AAPH nebo 1 mM H_2O_2 . Hladina ROS byla sledována pomocí fluorescenční sondy CM- H_2DCF -DA (kap. 4.9). Nejprve byla metoda optimalizována. Bylo zjištěno, že pro stejné koncentrace induktorů bylo nutné zvolit různé koncentrace CM- H_2DCF -DA. Při indukci ROS 1 mM AAPH byl použit 1 μM roztok sondy, při použití 1 mM H_2O_2 byla k buňkám přidána sonda o koncentraci 10 μM . Výsledná koncentrace testovaných látek byla 20 μM (stejně jako u TEAC a lipidové peroxidace). Stejně jako u obou předchozích metod byl společně se studovanými látkami testován i trolox. Buňky však z hlediska oxidačního stresu nikterak neovlivňoval. Tento úkaz je možné vysvětlit nedostatečným transportem troloxu přes cytoplasmatickou membránu buňky.

Při 20 μM koncentraci bylo ze všech 126 studovaných látek antioxidačně aktivních pouze těchto 7 (tabulka VI).

Tabulka VI. Látky s antioxidačními účinky na buněčném modelu.

Vzorek	Struktura	% ROS	
		1 mM AAPH	1 mM H ₂ O ₂
PBS		100	100
15		79 ± 5	86 ± 3
27		78 ± 10	87 ± 4
29		65 ± 11	89 ± 2
64		44 ± 3	38 ± 1
65		41 ± 4	62 ± 1
74		36 ± 2	50 ± 1
110		48 ± 10	79 ± 4

Výsledky jsou uvedeny v % ROS, kde 100% představuje hladinu ROS ve vzorcích s induktorem oxidačního stresu, ale bez použití antioxidantu. V tabulce je zobrazena schopnost látek snižovat hodnotu oxidačního stresu vyjádřená v procentech.

Jako kontrola sloužil 1% DMSO v PBS bez indukovaného oxidačního stresu. Tato přirozená hladina ROS v buňce představuje 19% hodnoty AAPH-indukovaného oxidačního stresu. Z toho plyne, že AAPH je schopen znásobit

přirozenou hladinu ROS více než pětkrát. Použitý H_2O_2 dokázal zvýšit přirozenou hladinu ani ne dvakrát (56%).

Aby byl vyloučen falešně pozitivní záznam antioxidační aktivity, byl u všech aktivních látek proveden test cytotoxicity (XTT test). V případě, že by látka byla pro buňky cytotoxická, bylo by v jamkách málo živých buněk, které mohou přijmout fluorescenční sondu, a i přes velké množství přítomných ROS by poskytovaly slabý fluorescenční signál. Proto byl proveden XTT test za stejných podmínek jako měření antioxidační aktivity (20 μM látka, 24 h inkubace, 10 000 buněk/jamka). Cytotoxicita nebyla prokázána ani u jedné z aktivních látek.

5.5 Porovnání použitých metod

Pro hodnocení antioxidačních vlastností všech 126 látek byly použity tři metody založené na různých principech (kap. 4). V první použité metodě (TEAC) byly antioxidačně aktivní látky s různým strukturním motivem. Dá se ale konstatovat, že všechny látky obsahující $-\text{SH}$ nebo $=\text{S}$ skupinu, a tudíž schopné snadno se oxidovat na sulfonové popř. sulfinové kyseliny, byly v TEAC aktivní. Měření bylo dokonce natolik citlivé, že bylo možné v jeho průběhu odhalit nečistotu u látky, u které k této aktivitě nebyl z hlediska struktury žádný důvod. Proto byla znovu podrobena analýze a ukázalo se, že obsahuje zbytky thiolového derivátu jako nečistoty a proto byla z dalších testů vyřazena. Dalšími skupinami látek aktivních v TEAC byly deriváty 7,9-dideaza-8-azaxanthinu a různě substituované pyrimidiny. Nelze ovšem jednoznačně konstatovat, že spojením dvou strukturních prvků zajišťujících antioxidační schopnost, se jejich celková aktivita bude sčítat, popř. jinak ovlivňovat. Jako příklad lze uvést v TEAC aktivní látku 126 (aktivnější než trolox), jejíž aktivita po substituci atomu vodíku za $-\text{SH}$ skupinu v poloze 2 na pyrimidinovém kruhu (látka 124) poklesla (tabulka IV). Přičemž bylo jasně prokázáno, že $-\text{SH}$ skupina antioxidační vlastnosti zvyšuje. Použití této metody je však limitováno rozpustností látek ve vodě (experiment probíhá ve vodném prostředí). Další nevýhodou je použití nefyziologického radikálu.

Naproti tomu, v procesu lipidové peroxidace se antioxidačně projevíly pouze deriváty 5-aminopyrimidinu (117, 119-126). Pravděpodobně jsou aktivní proto, že se velmi snadno oxidují a tato skutečnost byla potvrzena jejich oxidací vlivem

DMSO. Látka 121 uchovaná jako 10 mM roztok v DMSO sedm dní za laboratorní teploty už žádnou antioxidační aktivitu v procesu lipidové peroxidace nevykazovala. Vzhledem k tomu, že jsme pozorovali rozkladné reakce v biochemicky běžně používaném rozpouštědle, byly roztoky vzorků připraveny vždy čerstvé a pravděpodobně proto se podařilo stanovit až pětinasobně menší hodnotu IC_{50} než je popsána v literatuře (látka 121, [128]).

Třetím přístupem bylo sledování vlivu látek na buněčný model. V tomto případě se jedná o velmi složitý a komplexní systém, ve kterém hrají roli i na antioxidační aktivitě nezávislé účinky studovaných látek a jejich vlastnosti (metabolická stabilita, cytotoxicita, hydrofobicita atd.). Také vzhledem k velmi malému počtu antioxidačně aktivních látek (tabulka VI) nelze jednoznačně určit antioxidační farmakofor. Většinou se jedná o analogy nukleotidů (15, 27, 29 a 74), dále dva bromované deriváty pyrimidinu (64, 65), poslední zde uvedený antioxidačně aktivní derivát (110) se dá označit za analog pyrimidinové baze s objemným substituentem, který mu pravděpodobně zajišťuje přestup přes buněčnou membránu a u jehož strukturních analogů byla prokázána antioxidační aktivita na mikrosomálních lipidech *in vitro*. Na buněčné úrovni byly antioxidačně aktivní ještě další hydrofobní deriváty pyrimidinu, ale vzhledem k tomu, že jsou právě v patentovém řízení, není možné zobrazit jejich struktury.

6 Závěr

Byly zavedeny tři principiálně odlišné metody pro stanovení antioxidační aktivity (přímé zhašení indukovaného radikálu, vliv na lipidy během procesu peroxidace, buněčný model) a byla prostudována aktivita všech 126 testovaných látek. Výsledky získané těmito metodami byly mezi sebou porovnány. Bylo zjištěno, že žádná z použitých metod není univerzální a výsledky je nutné interpretovat s určitou opatrností. Z toho důvodu je kombinace více metod pro hodnocení antioxidační aktivity látek nanejvýš vhodná.

Hodnocení lipidové peroxidace stanovením koncentrace MDA spektrofotometricky a pomocí HPLC s fluorescenční detekcí poskytuje srovnatelné výsledky. Byla pozorována souvislost mezi antioxidační aktivitou a rychlostí rozpadu v DMSO. U látek nejaktivnějších, derivátů 5,6-diaminopyrimidinů, byl navržen mechanismus jejich antioxidačního účinku. Aminoskupina v poloze 5 na pyrimidinovém kruhu je nejprve oxidována na 5-oxoderivát za současného uvolnění amoniaku. Tato reakce je pravděpodobně pro antioxidační účinky klíčová. Čím rychleji je látka schopná se oxidovat, tím výraznější má antioxidační aktivitu. Reaktivní 5-oxoderivát kondenzuje s další molekulou výchozí látky. Produkt této reakce podléhá následné intramolekulární cyklizaci za vzniku stabilního konečného produktu. Tyto dvě následné reakce se už na antioxidačním procesu nepodílejí. Tento předpoklad byl potvrzen, produkt kondenzace ani produkt cyklizace nevykazovaly v procesu lipidové peroxidace antioxidační účinky.

Ukázalo se, že použití DMSO jako rozpouštědla při hodnocení antioxidačních vlastností látek je vzhledem k jeho oxidačním schopnostem nevhodné. DMSO oxida je antioxidanty již ve formě zásobních roztoků a tím negativně ovlivňuje stanovení jejich skutečné aktivity. Toto zjištění bylo potvrzeno při konfrontaci našich výsledků s literaturou. V případě, že je použití DMSO nevyhnutelné, je nutné připravovat roztoky vždy čerstvé těsně před analýzou.

7 Použitá literatura

- [1] Harman D.: *Biogerontology* **2009**, 10, 773.
- [2] Betteridge D. J.: *Metabolism* **2000**, 49, 3.
- [3] Pláteník J.: *Interní medicína pro praxi* **2009**, 11(1), 30.
- [4] Vodrážka Z., Krechl J.: *Bioorganická chemie*, 1.vydání, str. 339-408, SNTL, Praha 1991.
- [5] Vodrážka Z.: *Biochemie*, 2. opravené vydání, kniha 1., str. 95-100, Academia, Praha 2002.
- [6] Holý A.: *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*, 1. vydání, str. 7-20, Univerzita Palackého, Olomouc 2004.
- [7] Šorm F., Pískala A., Cihák A., Veselý J.: *Experientia* **1964**, 20(4), 202.
- [8] Chesney P. J., Teets K. C., Mulvihill J. J., Salit I. E., Marks M. I.: *J. Pediatr.* **1976**, 89(6), 1017.
- [9] Yue T. F., Gutman A. B.: *Am. J. Med.* **1964**, 37, 885.
- [10] Burchenal J. H., Murphy M. L., Ellison R. R., Sykes M. P., Tan T. C., Leone L. A., Karnofsky D. A., Craver L. F., Dargeon H. W., Rhoads C. P.: *Blood* **1953**, 8(11), 965.
- [11] Raguse J. D., Gath H. J., Bier J., Riess H., Oettle H.: *Clin. Oncol.* **2005** 17(6), 425.
- [12] Doong S. L., Tsai Ch. H., Schinazi R. F., Liotta D. C., Cheng Y. Ch.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 8495.
- [13] Soudeyngs H., Yao X. I., Gao Q., Belleau B., Kraus J. L., Nguyen-Ba N., Spira B., Wainberg M. A.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, 35(7), 1386.
- [14] Park N. H., Pavan-Langston D., McLean S. L.: *J. Infect. Dis.* **1979**, 140(5), 802.
- [15] Holý A.: *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 2567.
- [16] Pauwels R., Balzarini J., Schols D., Baba M., Desmyter J., Rosenberg I., Holý A., De Clercq E.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, 32(7), 1025.
- [17] De Clercq E.: *Int. J. Antimicrob. Agents* **1999**, 12(2), 81.
- [18] Holý A., Dvořáková H., Masojídková M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, 60, 1390.

- [19] De Clercq E.: *Pharmacology* **2001**, 56(1-2), 3.
- [20] Srinivas R. V., Fridland A.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42(6), 1484.
- [21] Holý A., Votruba I., Merta A., Černý J., Veselý J., Vlach J., Šedivá K., Rosenberg I., Otmar M., Hřebabecký H. et al: *Antiviral Res.* **1990**, 13(6), 295.
- [22] Snoeck R., Schols D., Andrei G., Neyts J., De Clercq E.: *Antiviral Res.* **1991**, 16(1), 1.
- [23] El-Gazzar A. B., Hafez H. N., Nawwar G. A.: *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44(4), 1427.
- [24] Spanou Ch., Manta S., Komiotis D., Dervishi A., Kouretas D.: *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, 8, 695.
- [25] Lauderback C. M., Breier A. M., Hackett J., Varadarajan S., Goodlett-Mercer J., Butterfield D. A.: *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1501(2-3), 149.
- [26] Floyd R. A., Lewis C. A.: *Biochemistry* **1983**, 22(11), 2645.
- [27] Richter Y., Fischer B.: *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 1063.
- [28] Baruch-Suchodolsky R., Fischer B.: *J. Inorg. Chem.* **2008**, 102(4), 862.
- [29] Vohlídal J., Julák A., Štulík K.: *Chemické a analytické tabulky*, 1.vydání, str. 52, Grada Publishing, Praha 1999.
- [30] Wichterle O., Petrů F.: *Anorganická chemie*, 3. vydání, str. 192-197, Nakladatelství Československé Akademie věd, Praha 1956.
- [31] Halliwell B., Gutteridge J. M.: *Free radicals in biology and medicine*, 4. vydání, str. 21, Oxford University Press 2007.
- [32] Wichterle O., Petrů F.: *Anorganická chemie*, 3. vydání, str. 198-200, Nakladatelství Československé Akademie věd, Praha 1956.
- [33] Halliwell B., Gutteridge J. M.: *Free radicals in biology and medicine*, 4. vydání, str. 23, Oxford University Press 2007.
- [34] Valgimigli L., Pedulli G. F., Paolini M.: *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 31(6), 708.
- [35] Buettner G. R., Jurkiewicz B. A.: *Free Radical Biol. Med.* **1993**, 14(1), 49.
- [36] Bhattacharjee S., Deterding L. J., Chatterjee S., Jiang J., Ehrenshaft M., Lardinois O., Ramirez D. C., Tomer K. B., Mason R. P.: *Free Radical Biol. Med.* **2011**, v tisku, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.034.
- [37] Davies M. J., Hawkins C. L.: *Free radical Biol. Med.* **2004**, 36(9), 1072.

- [38] Kwak H. S., Yim H. S., Chock P. B., Yim M. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92(10), 4582.
- [39] Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C.: *J. Biochem. Biophys. Methods* **2005**, 65, 45.
- [40] Indo H. P., Davidson M., Yen H. C., Suenaga S., Tomita K., Nishii T., Higuchi M., Koga Y., Ozawa T., Majima H. J.: *Mitochondrion* **2007**, 7(1-2), 106.
- [41] Komrsková D., Lojek A., Hrbáč J., Číž M.: *Luminescence* **2006**, 21, 239.
- [42] Lucas M., Solano F.: *Anal. Biochem.* **1992**, 206(2), 273.
- [43] Zhao H., Joseph J., Fales H. M., Sokoloski E. A., Levine R. L., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102(16), 5727.
- [44] Robinson K. M., Janes M. S., Pehar M., Monette J. S., Ross M. F., Hagen T. M., Murphy M. P., Beckman J. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103(41), 15038.
- [45] Zielonka J., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B.: *Nat. Protoc.* **2008**, 3(1), 8.
- [46] Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H. J., Nagano T.: *J. Biol. Chem.* **2003**, 278(5), 3170.
- [47] Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. P.: *Anal. Biochem.* **1997**, 253(2), 162.
- [48] Akasaka K., Suzuki T., Ohru H., Meguro H.: *Anal. Lett.* **1987**, 20, 797.
- [49] Meguro H., Akasaka K., Ohru H.: *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 157.
- [50] Posner G. H., Lever J. R., Miura K., Lisek C., Seliger H. H., Thompson A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 123(2), 869.
- [51] Murphy M. P.: *Biochem. J.* **2009**, 417(1), 1.
- [52] Chernyak B. V., Izyumov D. S., Lyamzaev K. G., Pashkovskaya A. A., Pletjushkina O. Y., Antonenko Y. N., Sakharov D. V., Wirtz K. W., Skulachev V. P.: *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1757(5-6), 525.
- [53] Kowaltowski A. J., de Souza-Pinto N. C., Castilho R. F., Vercesi A. E.: *Free Radical Biol. Med.* **2009**, 47(4), 333.
- [54] Smith R. A., Porteous C. M., Coulter C. V., Murphy M. P.: *Eur. J. Biochem.* **1999**, 263(3), 709.
- [55] Gutteridge J. M.: *Clin. Chem.* **1995**, 41(12), 1819.

- [56] Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H.: *Free Radical Biol. Med.* **1991**, 11(1), 81.
- [57] Stadtman E. R.: *Science* **1992**, 257(5074), 1220.
- [58] Obšil T., Pavlíček Z.: *Chem. Listy* **1997**, 91, 558.
- [59] Kasai H., Okada Y., Nishimura S., Rao M. S., Reddy J. K.: *Cancer Res.* **1989**, 49(10), 2603.
- [60] Coleman J. B., Gilfor D., Farber J. L.: *Mol. Pharmacol.* **1989**, 36(1), 193.
- [61] Babior B. M.: *New England J. Med.* **1978**, 298(12), 659.
- [62] Hessler J. R., Morel D. W., Lewis J., Chisolm G. M.: *Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol.* **1983**, 3(3), 215.
- [63] Carden D. L., Granger D. N.: *J. Pathol.* **2000**, 190(3), 255.
- [64] Touyz R. M.: *Hypertension* **2004**, 44(3), 248.
- [65] Zimmerman R., Cerutti P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, 81(7), 2085.
- [66] Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J.: *FASEB J.* **2003**, 17(10), 1195.
- [67] Klaunig J. E., Kamendulis L. M.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, 44, 239.
- [68] Rhoden W., Hasleton P., Brooks N.: *Brit. Heart J.* **1993**, 70(6), 499.
- [69] Kreisman H., Wolkove N.: *Semin Oncol.* **1992**, 19(5), 508.
- [70] Factor V. M., Laskowska D., Jensen M. R., Woitach J. T., Popescu N. C., Thorgeirsson S. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97(5), 2196.
- [71] Olanow C. W.: *Neurology* **1990**, 40, 32.
- [72] Dexter D. T., Carter C. J., Wells F. R., Javoy-Agid F., Agid Y., Lees A., Jenner P., Marsden C. D.: *J. Neurochem.* **1989**, 52(2), 381.
- [73] Alam Z. I., Jenner A., Daniel S. E., Lees A. J., Cairns N., Marsden C. D., Jenner P., Halliwell B.: *J. Neurochem.* **1997**, 69(3), 1196.
- [74] Hill J. M., Switzer R. C. 3rd: *Neuroscience* **1984**, 11(3), 595.
- [75] Good P. F., Olanow C. V., Perl D. P.: *Brain Res.* **1992**, 593(2), 343.
- [76] Korytowski W., Sarna T., Zar ba M.: *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 319(1), 142.
- [77] Behl C., Davis J. B., Lesley R., Schubert D.: *Cell* **1994**, 77(6), 817.
- [78] Mark R. J., Pang Z., Geddes J. W., Uchida K., Mattson M. P.: *J. Neurosci.* **1997**, 17(3), 1046.
- [79] McCord J. M., Edeas M. A.: *Biomed. Pharmacother.* **2005**, 59(4), 139.

- [80] Bai J., Rodriguez A. M., Melendez J. A., Cederbaum A. I.: *J. Biol. Chem.* **1999**, 274(37), 26217.
- [81] Štípek S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*, 1. vydání, str. 56, Grada Publishing, Praha 2000.
- [82] Antonenkov V. D., Sies H.: *Chem. Biol. Interact.* **1995**, 94(3), 169.
- [83] Štípek S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*, 1. vydání, str. 58, Grada Publishing, Praha 2000.
- [84] Davies M. J., Forni L. G., Willson R. L.: *Biochem. J.* **1988**, 255(2), 513.
- [85] Thomas S. R., Neužil J., Stocker R.: *Mol. Aspects Med.* **1997**, 18, S85.
- [86] Štípek S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*, 1. vydání, str. 62, Grada Publishing, Praha 2000.
- [87] Neužil J., Stocker R.: *J. Biol. Chem.* **1994**, 269(24), 16712.
- [88] Di Mascio P., Devasagayam T. P., Kaiser S., Sies H.: *Biochem. Soc. Trans.* **1990**, 18(6), 1054.
- [89] Bors W., Michel C., Stettmaier K.: *Biofactors* **1997**, 6(4), 399.
- [90] van Acker S. A., van Balen G. P., van den Berg D. J., Bast A., van der Vijgh W. J.: *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56(8), 935.
- [91] Re R., Pellegrini N., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26(9-10), 1231.
- [92] van den Berg R., Haenen G. R., van den Berg H., Bast A.: *Food Chem.* **1999**, 66(4), 511.
- [93] Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.: *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, 28(1), 25.
- [94] Cao G., Alessio H. M., Cutler R. G.: *Free Radical Biol. Med.* **1993**, 14 (3), 303.
- [95] Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R. L.: *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49(10), 4619.
- [96] Zulueta A., Esteve M. J., Frigola A.: *Food Chem.* **2009**, 114, 310.
- [97] Pedersen C. B., Kyle J., Jenkinson A. M., Gardner P. T., McPhail D. B., Duthie G. G.: *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, 54(5), 405.
- [98] Paulová H., Bochoraková H., Táborská E.: *Chem. Listy* **2004**, 98, 174.
- [99] Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K.: *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(11), 3122.

- [100] Rapta P., Mišík V., Staško A., Vrábel I.: *Free Radical Biol. Med.* **1995**, 18(5), 901.
- [101] Horinouchi Y., Tsuchiya K., Taoka C., Tajima S., Kihira Y., Matsuda Y., Shishido K., Yoshida M., Hamano S., Kawazoe K., Ikeda Y., Ishizawa K., Tomita S., Tamaki T.: *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 59(2), 208.
- [102] Buege J. A., Aust S. D.: *Methods Enzymol.* **1978**, 52, 302.
- [103] Gutteridge J. M., Quinlan G. J.: *J. Appl. Biochem.* **1983**, 5(4-5), 293.
- [104] Swierczynski J., Bannasch P., Mayer D.: *Biachim. Biophys. Acta* **1996**, 1315(3), 193.
- [105] Requena J. R., Chao C. C., Levine R. L., Stadtman E. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98(1), 69.
- [106] Loft S., Vistisen K., Ewertz M., Tjønneland A., Overvad K., Poulsen H. E.: *Carcinogenesis* **1992**, 13(12), 2241.
- [107] Procházková E.: *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova, Praha 2009.
- [108] Borthwick A. D., Biggadike K.: *Tetrahedron* **1992**, 48, 571.
- [109] Agrofoglio L., Suhas E., Farese A., Condom R., Challand S. R., Earl R. A., Guedj R.: *Tetrahedron* **1994**, 50, 10611.
- [110] Simons C., Wu Q., Htar T. T.: *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 5, 1191.
- [111] Herdewijn P., De Clercq E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11(12), 1591.
- [112] Šála M., Hřebabecký H., Masojídková M., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2004**, 69, 918.
- [113] Šála M., Hřebabecký H., Dračinský M., Masojídková M., De Palma A. M., Neyts J., Holý A.: *Tetrahedron* **2009**, 65, 9291.
- [114] Šála M., De Palma A. M., Hřebabecký H., Nencka R., Dračinský M., Leyssen P., Neyts J., Holý A.: *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 4374.
- [115] Jungmann O., Pfeleiderer W.: *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **2009**, 28(5), 550.
- [116] Andresen G., Gundersen L. L., Lundmark M., Rise F., Sundell S.: *Tetrahedron* **1995**, 51(12), 3655.
- [117] Benkovic S. J., Sammons D., Armarego W. L. F., Waring P., Inners R.: *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107(12), 3706.
- [118] Mařák D., Otmar M., Dračinský M., Votruba I., Holý A.: *Collection Symposium Series*; Hocek M., Ed.; Institute of Organic Chemistry and

- Biochemistry, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic: Prague, **2008**, 10, 426.
- [119] Mařák D., Otmar M., Votruba I., Holý A., Dračínský M., Krečmerová M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 652.
 - [120] Fischer M. A., Gransier T. J., Beckers L. M., Bekers O., Bast A., Haenen G. R.: *Clin. Chem. Lab. Med.* **2005**, 43(7), 735.
 - [121] Gillette J. R., Techniques for studying drug metabolism in vitro. In: B.N. La Du, H.G. Mandel and E.L. Way, Editors, *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*, p. 400-418, The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1971.
 - [122] Stoscheck C. M.: *Methods Enzymol.* **1990**, 182, 50.
 - [123] van Acker F. A., Hulshof J. W., Haenen G. R., Menge W. M., van der Vijgh W. J., Bast A.: *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 31(1), 31.
 - [124] Rat P., Korwin-Zmijowska C., Warnet J. M., Adolphe M.: *Cell Biol. Toxicol.* **1994**, 10(5-6), 329.
 - [125] Wang H., Joseph J. A.: *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 27(5-6), 612.
 - [126] Osseni R. A., Debbasch C., Christen M. O., Rat P., Warnet J. M.: *Toxicol. in Vitro* **1999**, 13(4-5), 683.
 - [127] Roehm N. W., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Grasebrook A. L.: *J. Immunol. Methods* **1991**, 142(2), 257.
 - [128] Rezk B. M., Haenen G. R., van der Vijgh W. J., Bast A.: *FEBS Lett.* **2003**, 555(3), 601.
 - [129] Taylor E. C., Loux H. M., Falco E. A., Hitchings G. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77(8), 2243.
 - [130] McMurry J.: *Organic chemistry*, 4. vydání, str. 734, 1183, Brooks/Cole Publishing Company 1996.
 - [131] Omura K., Swern D.: *Tetrahedron* **1978**, 34 (11), 1651.